

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
8 février 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/09194 A1

(51) Classification internationale des brevets:  
C07K 19/00, C12N 15/62,  
15/63, 5/10, G01N 33/53, A61K 39/00

GLAICHENHAUS, Nicolas [FR/FR]; 88, boulevard  
Mantega Righi, F-06100 Nice (FR). MALHERBE,  
Laurent [FR/FR]; 736, chemin des Ames du Purgatoire,  
Résidence Le Goya, F-06560 Valbonne (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02193

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-  
mengaud Aine, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 28 juillet 2000 (28.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(81) États désignés (national): JP, US.

(26) Langue de publication: français

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

(30) Données relatives à la priorité:  
99/09862 29 juillet 1999 (29.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-  
ENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,  
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement):

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: RECOMBINANT PROTEINS AND MOLECULAR COMPLEXES DERIVED THEREFROM, ANALOGOUS TO  
MOLECULES INVOLVED IN IMMUNE RESPONSES

(54) Titre: PROTEINES RECOMBINANTES, ET COMPLEXES MOLECULAIRES DERIVES DE CES PROTEINES, ANA-  
LOGUES A DES MOLECULES IMPLIQUEES DANS LES REPNSES IMMUNITAIRES

(57) Abstract: The invention concerns soluble recombinant proteins, consisting at least of a dimer which is itself formed by  $\alpha$  and  $\beta$  molecule chains of MHC class I or II. Said proteins are characterised in that they comprise at the carboxy-terminal end of one or both chains, all or part of a Fc region of immunoglobulin. The invention is applicable to recombinant proteins bound to an antigenic peptide in diagnosis or therapy.

(57) Abrégé: L'invention concerne des protéines recombinantes solubles, constituées au minimum d'un dimère lui-même formé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH de classe I ou II, caractérisées en ce qu'elles comportent à l'extrémité carboxy-terminale de l'une ou des 2 chaînes, tout ou partie d'une région Fc d'une immunoglobuline. Application des protéines recombinantes liées à un peptide antigénique en diagnostic et thérapeutique.

WO 01/09194 A1

1  
5 Protéines recombinantes, et complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses immunitaires.

10 L'invention se rapporte à des protéines recombinantes, et à des complexes moléculaires dérivés de ces protéines, analogues à des molécules impliquées dans les réponses immunitaires.

Elle concerne également une méthode de production de  
15 telles molécules et de tels complexes, ainsi que leurs applications, en particulier pour le diagnostic et en thérapeutique.

On connaît le rôle majeur, dans une réponse immunitaire, des molécules codées par le Complexe Majeur  
20 d'Histocompatibilité (CMH).

Ces molécules sont constituées de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne lourde, et la chaîne légère.

Les molécules du CMH sont exprimées à la surface des cellules présentatrices (cellules dendritiques, lymphocytes B,  
25 macrophages) sous la forme de complexes moléculaires avec des peptides antigéniques, eux-mêmes dérivés de protéines extracellulaires ou intracellulaires.

La reconnaissance de ces complexes peptide/CMH par un récepteur spécifique exprimé à la surface des lymphocytes T est  
30 à l'origine de toute réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Les molécules du CMH appartiennent à deux classes distinctes : celles de classe I, qui sont reconnues par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (cellules T cytotoxiques) et celles de classes II qui sont reconnues par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>  
35 (cellules T auxiliaires).

5 Pour être utilisables comme sondes permettant de  
dénombrer et de mesurer la fréquence des lymphocytes T  
spécifiques d'un antigène donné, de telles molécules et  
complexes doivent être produits sous forme soluble. Ces mêmes  
molécules et complexes solubles peuvent être utilisés pour  
10 moduler les réponses immunes.

La possibilité d'utiliser des molécules solubles du CMH  
pour détecter des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> a été démontrée pour la  
première fois par Altman et al en 1996 (1). Depuis cette date,  
de nombreuses équipes ont utilisé cette stratégie pour dénombrer  
15 et caractériser le phénotype de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> réagissant  
avec des peptides viraux, bactériens ou dérivés d'antigènes  
tumoraux. Toutefois, l'application de cette stratégie pour la  
détection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> s'est révélée problématique.

Dans la plupart des travaux publiés à ce jour, des  
20 systèmes d'expression bactériens ont été utilisés pour produire  
des molécules du CMH de classe I. Après incubation de ces  
molécules avec des peptides antigéniques, les complexes  
peptide/CMH ont été purifiés et obtenus sous forme de tétramères  
après incubation avec de la streptavidine. Cette dernière étape  
25 est rendue possible par l'addition à l'extrémité carboxy-  
terminale de la chaîne lourde du CMH d'un site de reconnaissance  
pour l'enzyme BirA, une enzyme bactérienne, qui est capable de  
catalyser l'addition d'une molécule de biotine. D'autres équipes  
ont choisi de produire des dimères de molécules du CMH de classe  
30 I en utilisant le squelette d'un anticorps. Dans ce cas, la  
chaîne lourde du CMH a été liée à la chaîne lourde d'une  
immunoglobuline (Ig en abrégé) et la  $\beta$ -2-microglobuline liée à la  
chaîne légère. Les régions Fc des chaînes lourdes s'associant  
par l'intermédiaire de ponts disulfures, les molécules produites  
35 sont des dimères de molécules du CMH.

5 Pour des raisons techniques, la préparation de sondes moléculaires se fixant sélectivement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> s'est avérée beaucoup plus difficile, vraisemblablement à cause de l'instabilité intrinsèque des molécules du CMH de classe II.

Des tétramères de molécules de classe II liées à un  
10 peptide antigénique, ou des dimères de ces molécules obtenus en utilisant le squelette d'un anticorps ont été produits.

Le problème de la stabilité et de l'affinité des récepteurs de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pour leur ligand est résolu, conformément à l'invention, par l'utilisation de constructions  
15 assurant la formation de dimères donnant des complexes multivalents grâce à l'utilisation de molécules comportant plusieurs sites de liaison pour certaines régions des dimères.

De telles constructions sont envisageables aussi bien pour des molécules de CMH de classe I que pour celles de classe  
20 II.

De manière avantageuse, de telles constructions sont suffisamment stables pour pouvoir être utilisées comme sondes moléculaires ouvrant ainsi un large champ d'application.

Ces constructions sont également utilisables pour  
25 obtenir des analogues de récepteurs des cellules T capables de reconnaître spécifiquement de telles molécules.

L'invention a donc pour but de fournir des molécules recombinantes et des complexes recombinants correspondants, dans lesquels ces molécules sont associées à des peptides  
30 antigéniques, de grande stabilité et de forte affinité pour leur ligand.

Elle vise également leur production dans des cellules hôtes à l'aide de vecteurs d'expression appropriés.

L'invention vise en outre les applications  
35 immunologiques de ces complexes comme sondes moléculaires.

5 Les protéines recombinantes solubles selon l'invention sont constituées au minimum d'un dimère lui-même formé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH de classe I ou II.

D'autres protéines recombinantes solubles selon l'invention sont constituées au minimum d'un dimère lui même  
10 formé de deux protéines constituées chacune de tout ou partie fusionnée des chaînes alpha et bêta des molécules du CMH de classe I ou II.

Ces dimères sont caractérisés en ce qu'ils comportent à l'extrémité carboxy-terminale de l'une ou des 2 chaînes, tout ou  
15 partie d'une région Fc d'une immunoglobuline.

"Partie d'une région Fc" désigne un fragment correspondant à un fragment naturel, ou modifié par rapport à un tel fragment naturel, par substitution et/ou par délétion et/ou par mutation, mais capable de se lier à une protéine possédant  
20 des sites de liaison pour la région Fc, telle que la protéine A ou la protéine G.

L'expression "capable de se lier" est illustrée par l'exemple 1C.

La région Fc correspond plus spécialement à tout ou  
25 partie du domaine  $CH_2$  et/ou  $CH_3$ . Ce domaine peut être modifié par rapport au domaine naturel, mais doit être capable, conformément à l'invention, de se lier à une protéine du type protéine A ou G possédant plusieurs sites de liaison pour la région Fc d'une Ig.

L'immunoglobuline comportant la région constante visée  
30 ci-dessus peut être une IgG, notamment les isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, une IgM, une IgA, une IgD ou une IgE.

Les protéines de l'invention sont plus particulièrement caractérisées en ce qu'elles comportent tout ou partie des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  des molécules du CMH.

5 De manière avantageuse, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  constituant le dimère comportent des glissières à leucine, ce qui favorise leur appariement.

De telles glissières à leucine sont par exemple décrites par Scott et al (2) ou Kalandadze et al (3).

10 L'invention vise en particulier les molécules recombinantes associées en plusieurs dimères et notamment en tétramères et tout spécialement en octamères.

De telles molécules recombinantes sont complexées avec une protéine naturelle ou artificielle comportant plusieurs  
15 sites de liaison pour les régions constantes des immunoglobulines et permettant ainsi de créer des multimères de dimères. On citera à titre d'exemple la protéine A communément isolée à partir de *Staphylococcus aureus*, ou encore la protéine G de *Streptococcus* (groupe C), ou des multimères de récepteur des  
20 régions Fc obtenus par recombinaison génétique.

Les molécules recombinantes telles que définies ci-dessus complexées à des peptides antigéniques constituent des analogues de CMH. Il s'agit de protéines recombinantes soluble caractérisées en ce qu'elles sont liées de manière covalente ou  
25 non covalente à un peptide antigénique. L'invention vise de tels complexes, caractérisés en ce qu'ils comportent à l'extrémité -NH<sub>2</sub> de la chaîne  $\beta$ , un peptide antigénique fixé par l'intermédiaire d'un bras flexible. Ce bras peut avoir une longueur variable et permet le positionnement du peptide  
30 antigénique dans le sillon formé par le ou chaque dimère. De telles fixations sont décrites par exemple par Kozono et al (4) et (5).

Les molécules définies ci-dessus sont obtenues avantageusement selon les techniques décrites dans les Manuels  
35 de Biologie Moléculaire pour la préparation des gènes recombinants et leur expression dans des cellules eucaryotes ou

5 procaryotes. On se réfèrera ainsi par exemple aux ouvrages de Sambrook et al (6) ou de Ausubel et al (7).

Les séquences nucléotidiques de l'invention possèdent un cadre de lecture correspondant à tout ou partie d'une protéine telle que définie ci-dessus.

10 Les séquences codant pour les fragments recombinants constitutifs des molécules définies ci-dessus sont introduites dans des vecteurs d'expression. On utilise généralement autant de vecteurs d'expression que de fragments. Mais il est également possible, en variante, d'utiliser un même vecteur pour plusieurs  
15 fragments. Comme vecteurs d'expression, on utilisera avantageusement des plasmides et notamment des plasmides possédant un marqueur de sélection. Des résultats d'expression satisfaisants ont été ainsi obtenus avec des plasmides capables de se répliquer dans des bactéries et comportant, comme marqueur  
20 de sélection, un gène de résistance à un antibiotique.

Les promoteurs seront choisis de manière à permettre l'expression du gène recombinant dans le système d'expression utilisé. On citera à titre d'exemple le promoteur reconnu par la polymérase du bactériophage T4 ou, lorsqu'on utilise comme  
25 système d'expression des cellules de Drosophile, le promoteur du gène de la métallothionéine.

Comme systèmes d'expression eucaryote, on citera les systèmes baculovirus recombinants dans des cellules d'insecte,  
30 de cellules de Drosophile, des cellules de Hamster (lignée CHO) et des cellules de Singe (lignée COS). On peut également effectuer une expression dans des cellules de levure.

Comme systèmes d'expression procaryote, les bactéries sont largement utilisées, en particulier *E.coli*.

35 Les molécules recombinantes produites sont purifiées sur des colonnes d'immunoaffinité, notamment avec des anticorps

5 monoclonaux ou polyclonaux, spécifiques des molécules d'intérêt, ou encore avec des matériaux supports comme des billes, notamment des billes d'agarose.

D'autres protocoles de purification peuvent être envisagés. En particulier, par exemple lorsque les molécules à  
10 purifier comportent 6 résidus histidine consécutifs, des billes d'agarose recouvertes de nickel peuvent être utilisées pour purifier les molécules.

Les molécules purifiées obtenues sont alors mises à incuber avec les protéines possédant les sites de liaison pour  
15 la région Fc.

Ces protéines sont avantageusement marquées aux fins de détection, par exemple par un fluorophore.

Lorsque la molécule obtenue ne comporte pas de peptide antigénique, et qu'on souhaite disposer de complexes peptide  
20 antigénique/analogue de CMH, on la fait incuber avec ce peptide *in vitro*.

L'étude des molécules recombinantes selon l'invention a permis de mettre en évidence leur grande stabilité et une forte affinité dans les essais de reconnaissance immunologique.

25 L'invention fournit ainsi des outils de grand intérêt pour la modulation des processus immunologiques.

Elle vise en particulier l'utilisation des complexes peptide antigénique/analogues de CMH de classe II pour dénombrier et/ou purifier les lymphocytes T réagissant avec un antigène  
30 donné et pour caractériser le phénotype de ces cellules, c'est-à-dire déterminer ou identifier les molécules qu'elles sécrètent ou qu'elles expriment à leur surface. Cette détection est réalisée sur un prélèvement effectué sur un patient. Il peut s'agir d'un prélèvement sanguin, ou effectué sur des organes  
35 lymphoïdes secondaires, comme les ganglions lymphatiques, la rate, ou encore sur des tumeurs.



5 Ces molécules peuvent avantageusement être utilisées pour dénombrer ou pour purifier ces cellules à partir de suspensions cellulaires comme décrit ci-dessus.

Alternativement, elles peuvent être utilisées pour visualiser ces cellules sur des coupes cellulaires.

10 Il est ainsi possible de préciser le statut immunologique d'un individu.

Cette application revêt un grand intérêt pour le développement de vaccins contre certains agents pathogènes ou de vaccins anti-tumoraux.

15 On sait que pour juger de l'efficacité d'un vaccin, le meilleur moyen consiste à vacciner un grand nombre d'individus et à suivre le devenir de cette population lorsqu'elle est exposée à l'agent infectieux dans des conditions naturelles. Cette approche est toutefois difficile à cause notamment des  
20 coûts considérables qu'elle engendre, et de la difficulté de trouver suffisamment de volontaires.

L'utilisation des complexes selon l'invention, en tant que sondes moléculaires se fixant sélectivement à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de spécificité donnée, permet de comparer  
25 rapidement l'efficacité de différentes préparations vaccinales et de déterminer le nombre et les intervalles optimaux entre les rappels.

Dans une étude en pré-clinique, on inocule des individus avec des préparations vaccinales renfermant le ou les  
30 antigènes, puis on dénombre les cellules T présentes dans un prélèvement, réagissant avec des complexes selon l'invention. La réponse des individus permet d'apprécier la réaction vis-à-vis du peptide antigénique.

Cette application peut être également mise en oeuvre  
35 comme moyens prédictifs quant à l'état d'un patient, en

5 dénombrant et en déterminant le phénotype de cellules T autoréactives chez des malades à risques.

L'invention permet ainsi de déterminer le stade d'avancement de la maladie chez des patients souffrant de maladies auto-immunes ou d'évaluer l'efficacité de certains  
10 traitements ou d'interventions thérapeutiques.

L'invention vise également l'application desdits complexes multivalents définis ci-dessus dans le diagnostic et la mise au point de traitements de maladies auto-immunes.

Un certain nombre de maladies auto-immunes sont dues à  
15 la mobilisation de lymphocytes T auto-réactifs qui provoquent la destruction des tissus de l'organisme. Dans certains cas, par exemple chez les diabétiques, le diagnostic de la maladie n'est effectué que tardivement lorsque les tissus sont déjà détruits. Pour empêcher la destruction des tissus, et bloquer le  
20 développement de la maladie, il est indispensable d'effectuer un diagnostic précoce. La possibilité de dénombrer, grâce à l'invention, les lymphocytes T auto-réactifs dans le sang des patients à risque constitue une avancée considérable.

Prenant en compte que les lymphocytes T auto-réactifs  
25 jouent un rôle déterminant dans le développement des maladies auto-immunes, de très nombreuses stratégies thérapeutiques visent à éliminer ces lymphocytes, ou à les empêcher d'exercer leur pouvoir pathogène, on mesurera l'intérêt de pouvoir dénombrer grâce à l'invention les lymphocytes T auto-réactifs  
30 dans le sang des patients traités, de comparer l'efficacité de différents traitements, et d'adapter le traitement en fonction de la réponse du malade.

Selon un autre aspect, l'invention vise l'application des complexes pour l'enrichissement en un type de cellules T  
35 donné.

5            Cette application permet de disposer de grandes quantités de cellules T spécifiques d'un antigène donné *in vitro* à des fins de thérapie cellulaire. Ces cellules peuvent être en effet ré-inoculées à des patients à titre préventif ou curatif. On peut là encore dénombrer et déterminer, avant l'inoculation,  
10 le phénotype des cellules T complexées.

          L'invention vise encore l'application des molécules recombinantes multivalentes comme agents stimulants des cellules T.

          Ces molécules peuvent être inoculées à un individu pour  
15 stimuler l'expansion et/ou l'activation de cellules T spécifiques d'un antigène donné en l'absence de toute autre cellule, en particulier de cellules présentatrices.

          Cette utilisation est donc intéressante pour stimuler des réponses immunitaires insuffisantes par exemple vis-à-vis de  
20 complexes CMH/antigène tumoral.

          Dans le cas de maladies infectieuses, on inocule *in vivo* les molécules recombinantes, le cas échéant après une étape de propagation préalable *ex vivo*.

          D'autres caractéristiques et avantages de l'invention  
25 sont donnés, à titre purement illustratif, dans les exemples qui suivent et en se référant aux figures 1 à 5, qui représentent respectivement

- la figure 1 représente la séquence de l'insert d'ADNc de la chaîne  $\alpha$  du CMH,

30 - la figure 2, la construction plasmidique contenant l'insert d'ADNc de la figure 1,

- la figure 3, la séquence de l'insert d'ADNc de la chaîne  $\beta$  du CMH,

11

- 5 - la figure 4, la construction plasmidique contenant l'insert d'ADNc de la figure 3,
- la figure 5, la construction plasmidique détaillée de la figure 4, et
- la figure 6, un octamère peptide/CMH de classe II selon l'invention.

Exemple 1 : Production de complexes peptide/CMH de type

II

1. Construction des plasmides recombinants

- 15 . Construction de l'ADNc codant pour la protéine recombinante IA $\alpha^d$ /Fc (clone 461) et insertion dans un plasmide

Cette construction est illustrée par la figure 1 qui donne la séquence d'ADNc, de la position 420 à 1940, et celle du peptide codé (437-1921) (SEQ ID N° 1).

- 20 L'ADNc comprend, ligués entre eux, successivement, les fragments codant pour le peptide signal d'IA $^d$ , IA $^d\alpha$ , un linker, une glissière à leucine acide, un linker, une région Hinge, la région CH<sub>2</sub>, puis la région CH<sub>3</sub> de Fc.

- 25 Cette construction est insérée dans le plasmide représenté sur la figure 2 et placée pour le contrôle d'un promoteur de métallothionéine inductible par CuSO<sub>4</sub>.

- . Construction de l'ADNc codant pour la protéine recombinante LACK/I-A  $\beta^d$ /glissière à leucine (clone 268) et insertion dans un
- 30 plasmide

Cette construction est illustrée par la figure 3, qui donne la séquence d'ADNc, de la position 420 à 1370, et celle du peptide codé (440-1359) (SEQ ID N° 2)

- L'ADNc comprend successivement les fragments, ligués entre eux,
- 35 : codant pour une séquence leader,  $\beta 1$ , un peptide LACK (158-73),

5 un linker, un site thrombine, un linker,  $IA\beta^d$  ( $\beta_1$ )  $IA\beta^d$  ( $\beta_2$ ), un linker, une glissière à leucine basique, un marqueur à motifs histidine.

Cette construction est insérée dans le plasmide représenté sur la figure 4, et détaillé sur la figure 5.

10 2. Transfection des plasmides dans des cellules de Drosophile

3. Sélection des transmettants stables

Les étapes 2 et 3 sont réalisées en opérant selon (6).

4. Production et purification des complexes

15 A) Production

On met en culture les cellules transfectées de Drosophile dans des flacons de 3 l, à 24°C, dans un milieu SFM Drosophile (GIBCO-BRL), supplémenté avec 1% de SVF (sérum de veau foetal).

Lorsque la densité cellulaire atteint  $5 \times 10^6$  cellules/ml, on induit la production de molécules LACK/IAd en ajoutant  $CuSO_4$  à la concentration finale de 1 mM, puis on soumet le milieu à incubation durant 5 à 6 jours.

25 On recueille les surnageants et, par centrifugation, on élimine les débris cellulaires (20 min, 10K, 4°C). Les surnageants sont ensuite transférés dans des tubes et à nouveau centrifugés.

On concentre les surnageants 8 à 10 fois en utilisant un concentrateur Prepscale<sup>R</sup> (Millipore, Inc.) On congèle à -70°C jusqu'à l'obtention de 500 ml de surnageants concentrés.

B) Purification

5           On décongèle les surnageants à 37°C. On centrifuge 15 min à 10K. Les surnageants sont ensuite transférés dans de nouveaux tubes et à nouveau centrifugés 15 min à 10 K.

          On les charge alors sur une colonne d'immunoaffinité MK-D6 (volume de lit 5 ml), équilibrée au préalable dans un  
10 tampon A de 20 mM de phosphate de sodium pH 7,0. La vitesse d'élution est de 10 à 20 ml/h.

          La colonne est lavée avec 30 ml de tampon A (6 fois le volume de lit) à 0,5 ml/min.

          Pour l'élution, on utilise 15 ml de CAPS 50 mM pH 11,5  
15 en opérant par gravité.

          On recueille 15 fractions de 1 ml chacune.

          Chaque fraction est neutralisée avec 300 µl de phosphate de sodium (200 mM, pH 6,2). On ajoute immédiatement des inhibiteurs de protéase (Complete<sup>R</sup>, Roche Diagnostics) dans  
20 chaque échantillon.

          On neutralise la colonne avec le tampon A.

          Pour éviter l'aggrégation des molécules de peptide/CMH, on effectue immédiatement une chromatographie par échange d'ions après l'élution.

25           On détermine la concentration protéique de chaque fraction par électrophorèse en gel dénaturant.

          Les fractions positives sont rassemblées et chargées sur colonne échangeuse d'ions (Mono Q) (Pharmacia Biotech).

          On utilise un tampon B : Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 et un  
30 tampon C : Tris-HCl 20 mM pH 8,0 + 1M NaCl.

          On opère selon les gradients suivants :

          0-5 min : 0% C ; 5-20 min : 0-50% C ; 20-21 min : 50-100% C ; 21-25 min : 100% C ; 25-26 min : 100% C ; 26-30 min : 0%C.

5 Les molécules LACK/IA<sup>14</sup> éluent généralement à 30-36% en tampon C. On recueille les fractions correspondant au pic d'élution et on détermine la concentration protéique par électrophorèse en gel dénaturant.

10 Les fractions positives sont rassemblées et dialysées à 4°C contre 2 l de PBS, pH 7,4.

On change le tampon de dialyse 2 fois en 24 h. La concentration en protéines est déterminée selon le test BCA (Biorad). Les échantillons sont congelés à -70°C en petites fractions (8 µg). Les rendements sont de l'ordre de 0,5 mg/l de surnageant cellulaire.

15

#### C. Production de complexes multivalents (figure 6)

On prépare une solution de protéine A-couplée à un fluorophore constitué par Alexa 488<sup>R</sup> (sondes moléculaires # P-11047) à une concentration de 0,5 mg/ml dans PBS 1 X, pH 7,4.

20 (Protéine A de Sigma)

Des aliquotes de 100 µl sont préparés et congelés à -20°C.

Un aliquote de molécule peptide/CMH (8 µg) est décongelé et on ajoute 1,1 µl de protéine A couplée au fluorophore Alexa. On soumet le mélange à incubation à température ambiante pendant 30 min, puis on ajoute un mélange PBS/ASB (albumine de sérum bovin) 0,1 % pour un volume final de 50 µl. On ajoute 1 µl de sérum de souris et on utilise directement le produit comme réactif de coloration.

25

30 D- Cytofluorométrie de flux

15

5           On purifie des cellules T à partir des ganglions  
lymphatiques d'une souris. On transfère  $10^6$  cellules dans un tube  
et on ajoute le réactif de coloration. Deux heures plus tard,  
les cellules sont lavées en tampon isotonique et analysées en  
cytofluorométrie de flux. La fréquence des cellules réagissant  
10 avec le réactif de coloration est déterminée par cette méthode.



5

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1/ Altman et al, Science, volume 274, 4 octobre 1996.

2/ Scott et al, J. Exp. Med. 183:2087-2095, 1996.

3/ Kalandadze et al, J Biol Chem. 271 (33) : 20156-62,  
1996.

10

4/ Kozono et al, Nature. 369 : 151-153, 1994.

5/ Kozono et al, Immunity. 3: 187-196, 1995.

6/ Sambrook et al, Molecular Cloning : second Edition  
(1989).

7/ Ausubel et al, Current Protocols in Molecular  
15 Biology, Ed John Wiley and Sons, Inc., 1997.

5

## REVENDICATIONS

1/ Protéines recombinantes solubles, constituées au minimum d'un dimère lui-même formé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH de classe I ou II, caractérisées en ce qu'elles comportent à l'extrémité carboxy-terminale de l'une ou des 2 chaînes, tout ou partie d'une région Fc d'une immunoglobuline.

2/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles comportent tout ou partie des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  des molécules du CMH.

3/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles comportent tout ou partie du domaine CH<sub>2</sub> et/ou CH<sub>3</sub> de la région Fc.

4/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que les chaînes qui constituent le dimère comportent des glissières à leucine.

5/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles sont associées en plusieurs dimères et notamment en tétramères ou en octamères.

6/ Protéines recombinantes solubles selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce qu'elles sont complexées à des protéines naturelles ou artificielles, comportant plusieurs sites de liaison pour les régions constantes des immunoglobulines, telles que la protéine A, la protéine G, ou des multimères de récepteur des régions Fc obtenus par recombinaison génétique.

5           7/ Protéines recombinantes solubles selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce  
qu'elles sont liées de manière covalente ou non covalente à un  
peptide antigénique.

10           8/ Protéines recombinantes solubles selon la  
revendication 7, caractérisées en ce que le peptide antigénique  
est fixé à l'extrémité amino-terminale de la chaîne  $\beta$  par  
l'intermédiaire d'un bras flexible.

15           9/ Séquences nucléotidiques possédant un cadre de  
lecture correspondant à tout ou partie d'une protéine selon  
l'une quelconque des revendications 1 à 8.

          10/ Vecteurs d'expression, notamment plasmides,  
caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence selon la  
revendication 9.

20           11/ Cellules procaryotes ou eucaryotes porteuses d'au  
moins un vecteur selon la revendication 10.

          12/ Utilisation des protéines selon la revendication 7  
ou 8, pour dénombrer et/ou purifier les lymphocytes T réagissant  
avec un antigène donné et pour caractériser le phénotype de ces  
cellules.

25           13/ Utilisation selon la revendication 12, comme  
protéines immunostimulantes, notamment pour le développement de  
vaccins.

30           14/ Utilisation selon la revendication 12, comme moyen  
prédictif de l'état d'un patient pour dénombrer et déterminer le  
phénotype de cellules T autoréactives chez des malades à  
risques, ou à des fins thérapeutiques.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/02193

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/10 G01N33/53  
A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, STRAND

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 06749 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 February 1998 (1998-02-19) the whole document	1-16
X	WO 98 03552 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 29 January 1998 (1998-01-29) the whole document	1-7,9-16
X	WO 93 10220 A (ANERGEN, INC.) 27 May 1993 (1993-05-27) the whole document	1-3,6,7, 9-16
Y		4,5,8
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 October 2000

Date of mailing of the international search report

16/10/2000

Name and mailing address of the ISA

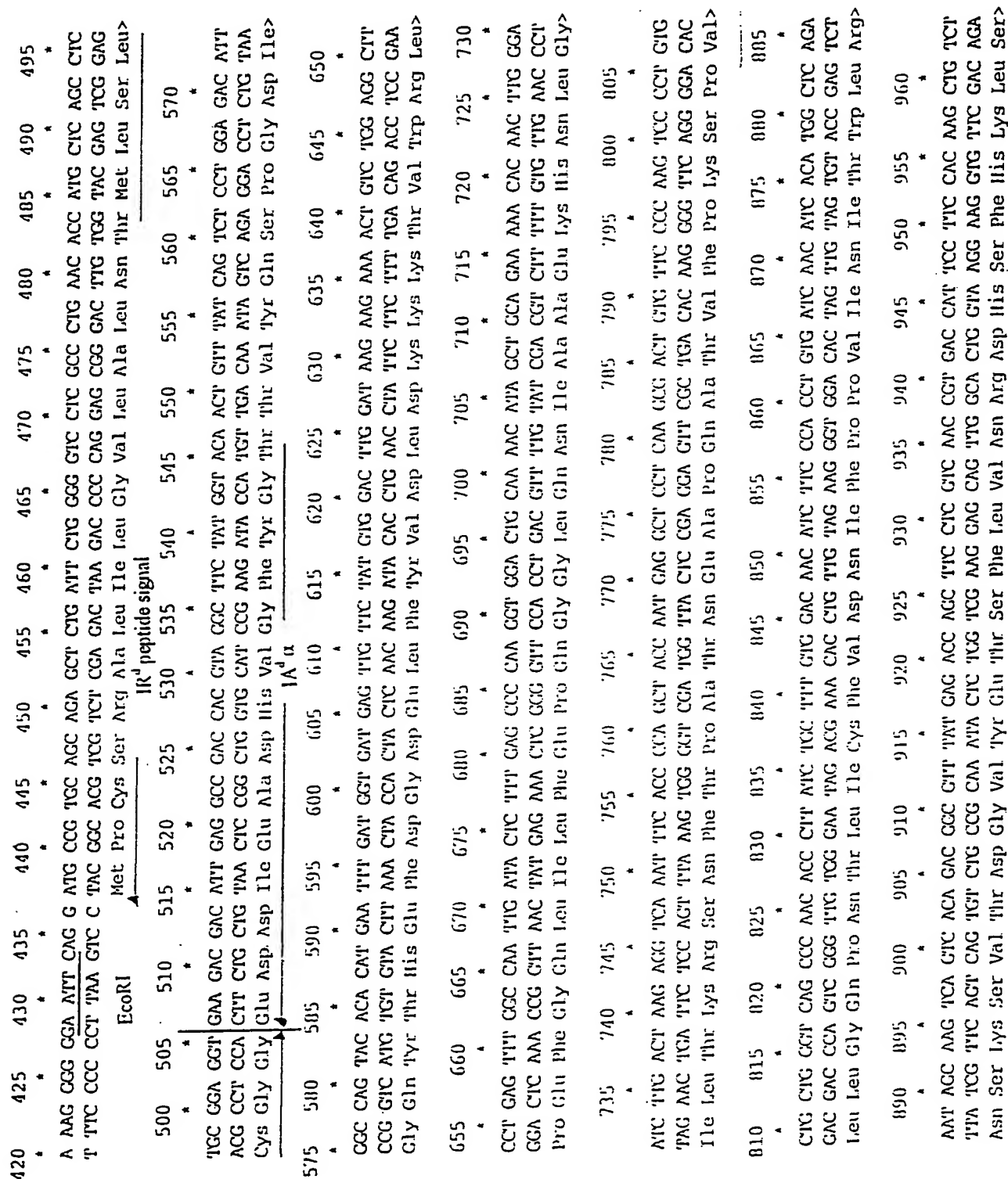
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2200 MB Dordrecht

Authorized officer

5           15/ Utilisation des protéines selon la revendication 7  
ou 8, pour la purification et/ou l'enrichissement de lymphocytes  
T spécifiques d'un antigène donné, soit à partir de cultures  
cellulaires, soit à partir de prélèvements sur un patient.

10           16/ Utilisation selon la revendication 15, caractérisé  
en ce que les populations de lymphocytes T enrichies en un type  
de cellules T donné sont utilisées à des fins de thérapie  
cellulaire.

FIGURE 1



965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040

TAT C'IC ACC T'IC ATC CCT TCT GAT GAT GAC ATT TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TGG GGC CTG GAG GAG CCG GTT CTG  
ATA GAG TGG AAG TAG GGA AGA CTA CTA CTG TAA ATA CTG ACG T'IC CAC C'IC GAG ACC CCG GAC C'IC C'IC GGC CAA GAC  
'Tyr Leu Thr Phe Ile Pro Ser Asp Asp Ile 'Tyr Asp Cys Lys Val Glu His Trp Gly Leu Glu Glu Pro Val Leu>

1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120

AAA CAC TGG GMA CCT GAG ATT CCA GCC CCC ATG TCA GAG CTG ACA GMA ACT GGA GGT GGA CGA TCC ACT ACA GCT CCA  
'Tyr GAG ACC CTT GGA C'IC TAA GGT CCG GGG TAC AGT C'IC GAC TGT CTT TGA CCT CCA CCT CCT AGG TGA TGT CGA GGT  
Lys His Trp Glu Pro Glu Ile Pro Ala Pro Met Ser Glu Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Ser Thr Thr Ala Pro>

1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195

'CA GCT CAG C'IC GMA AAA GAG C'IC CAG GCC CTG GAG AAG GAA ATT GCA CAG C'IC GMA TGG GAG T'IG CAA GCA C'IG GAA  
AGT CGA G'IC GAG CTT TTT C'IC GAG G'IC CCG GAC C'IC T'IC CTT TTA CGT G'IC GAC C'IC ACC C'IC AAC G'IT CGT GAC C'IT  
Ser Ala Gln Leu Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Glu Lys Glu Asn Ala Gln Leu Glu Trp Glu Leu Gln Ala Leu Glu>

1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275

ANG GMA C'IG GCT CAG GCA CCA TCT GAG CCC AGA GGG CCC ACA ATC AAG CCC TGT CCT CCA TCC AAA TCC CCA GCA CCT  
'TTC CTT GAC CGA GTC CGT CGT AGA C'IC GGG TCT CCC CCG TGT T'AG T'IC CCG ACA GGA GGT ACG TTT ACG GGT CGT GGA  
Lys Glu Leu Ala Gln Ala Ala Ser Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro>

1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350

AAC C'IC T'IG GGT OGA CCA TCC C'IC T'IC ATC T'IC CCT CCA AAG ATC AAG GAT GTA C'IC ATC ATC TCC C'IG AGC CCC ATA  
'TIG GAG AAC CCA CCT GGT ACG CAG AAG TAG AAG CGA GGT T'IC TAG T'IC CTA CTT GAG TAC TAG AGG GAC TCG GGG TAT  
Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile>

1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430

C'IC ACA TCT C'IG C'IG GAT GTG ACC GAG GAT GAC CCA GAT G'IC CAG ATC AGC TCG TTT G'IG AAC AAC C'IG GMA GTA  
CAG TCT ACA CAC CAC CTA CAC TCG C'IC CTA C'IG GGT CTA CAG G'IC T'AG TCG ACC AAA CAC CAC T'IG T'IG CAC CTT CAT  
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val>

1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510

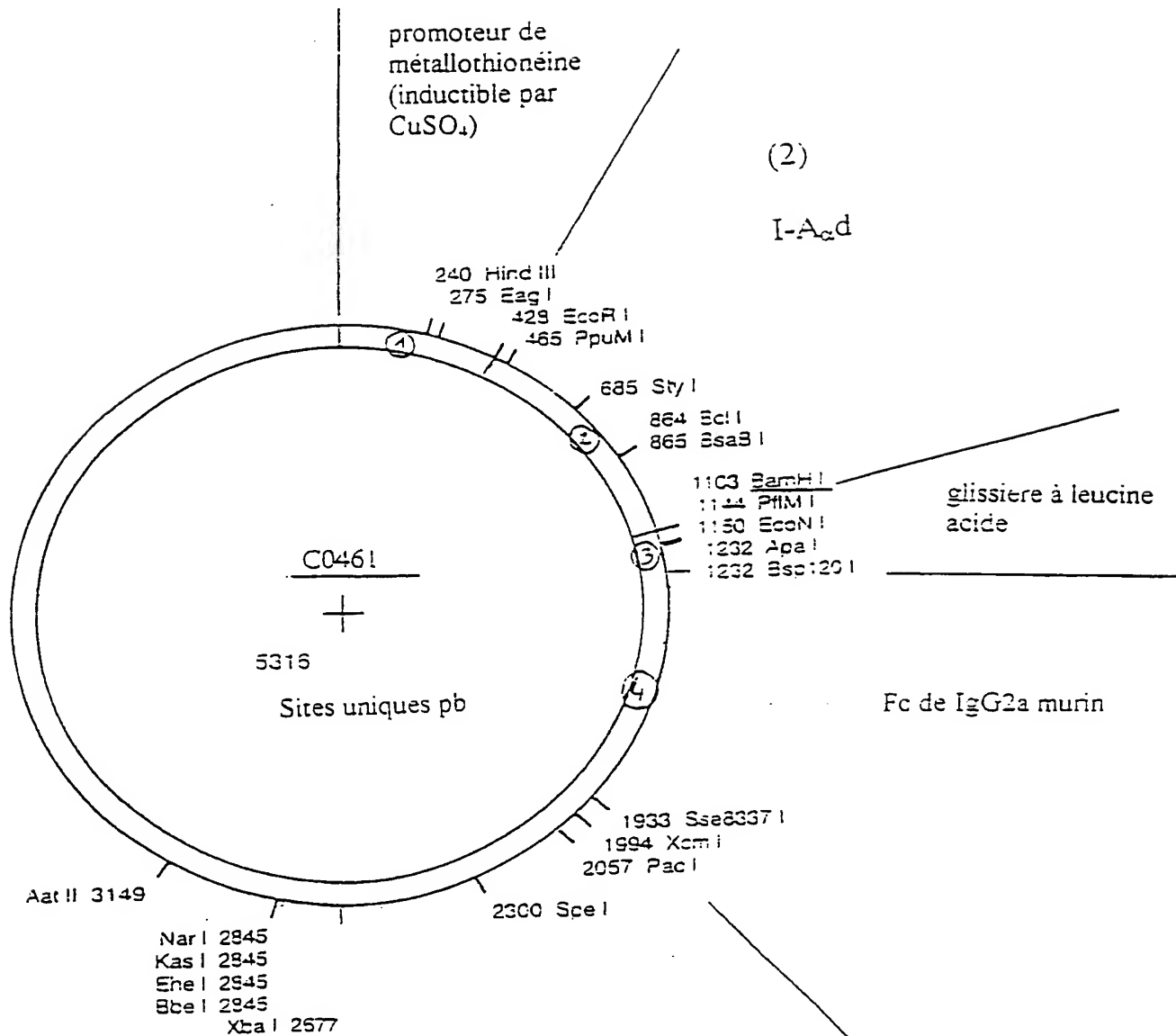
CAC ACA GCT CAG ACA CAA ACC CATT AGA CAG GAT TAC AAC AGT ACT C'IC CCG G'IC AGT CCC C'IC CCC ATC CAG CAC  
G'IG TCT CGA G'IC TGT GTT TCG G'IA TCT C'IC CTA ATG T'IG TCA TGA GAG GCC CAC CAG TCA CCG GAG GGT TAG GTC G'IG  
His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His>

1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585  
 CAG GAC TGG AAG AGT GGC AAG GAG TTT CAG TTT AAG GAT CTT CCA CCG CCC ATC GAG AGA ACC ATC  
 GTC CAG ACC TAC TCA CCG TTT CAG TTT AAG TTT ACG TTT CAG TTT TTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT  
 Gln Asp TTP Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile>  
 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665  
 TCA AAA CCC AAA GGG TCA GTA AGA GGT CCA CAG GAT TAT GTC TTT CTT CCA CCA GAA GAG AIG ACT AAG AAA CAG  
 AGT TTT GGG TTT CCC AGT CMT TCT CGA GGT GTC CMT ATA CAG AAC GGA GGT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT  
 Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln>  
 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740  
 GTC ACT CTT ACC TGC AAT GTC ACA GAC TTT AIG CTT GAA GAC ATT TAC GTC GAG TGG ACC AAC AAC GGC AAA ACA GAG  
 CAG TGA GAC TGG ACG TAC CAG TCT CTT CAG TAC CCA CTT CTT CTT TAA AIG CAC CTT ACC TGG TTT TTT CTT CTT CTT  
 Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Thr Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu>  
 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820  
 CTA AAC TAC AAG AAC ACT GAA CCA GTC CTT GAC TCT GAT GAT GAT TCT TAC TTT AIG TAC ACC AAG CTT GAG CTT GAA AAG  
 GAT TTT AIG TTT  
 Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys>  
 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900  
 AAG AAC TGG CTT GAA AGA AAT AGC TAC TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT  
 TTT TTT ACC CAC CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 Lys Asn Thr Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Thr Thr Lys Ser>  
 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935  
 TTT TCT CCG ACT CCG GGT AAA TCA TG ACT CCA CTT G  
 AAG AAG GGC TGA GGC CCA TTT ACT AC TCA GGT CCA C  
 Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys \*\*\*>

No Sal I Site



FIGURE 2





965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040  
 \* \* \* \* \*  
 ACT CTG GTC TGT TCG GTC ACA GAT TTC TAC CCA CCC AAG AAC AAC CAG CAG GAG ACA  
 Thr Leu Val Cys Ser Val Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Lys Ile Lys Val Arg Trp Phe Arg Asn Gly Gln Glu Thr>

1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120  
 \* \* \* \* \*  
 GTG GCG GTC TCA TCC ACA CAG CTT ATT ACG AAT GCG GAC TCG ACC TTC CAG CTC CTC GTC ATG CTG GAG ATG ACC CCT  
 Val Gly Val Ser Ser Thr Gln Leu Ile Arg Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Val Met Leu Glu Met Thr Pro>

1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195  
 \* \* \* \* \*  
 CATT CAG CGA GAG GTC TAC ACC TGC CATT CTG CAG CATT CCC ACG CTC AAG ACC CCC ATC ACT GTG GAG TCG AGG GCA CAG  
 His Gln Gly Glu Val Tyr Thr Cys His Val Glu His Pro Ser Leu Lys Ser Pro Ile Thr Val Glu Trp Arg Ala Gln>

1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275  
 \* \* \* \* \*  
 TCC GAG TCT CCC CCG ACC AAG CGA GGT CGA TCA TCC ACT ACA GCT CCA TCA CCT CAG TTG AAA AAG AAA TTG CAA CCA  
 Ser Glu Ser Ala Arg Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Thr Ala Pro Ser Ala Gln Leu Lys Lys Lys Lys Leu Gln Ala>  
 Linker

1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350  
 \* \* \* \* \*  
 CTG AAG AAA AAG AAC GCT CAG CTG AAG TTG AAA CTT CAA GCC CTC AAG AAG AAA CTC GCC CAG CATT CATT CATT CATT  
 Leu Lys Lys Lys Asn Ala Gln Leu Lys Trp Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Leu Ala Gln His His His His His  
 glissière à leucine basique  
 HISTAG

1355 1360 1365 1370  
 \* \* \* \*

CATT TGA GT CGA CCT GC

His \*\*\*>

Sall

FIGURE 4

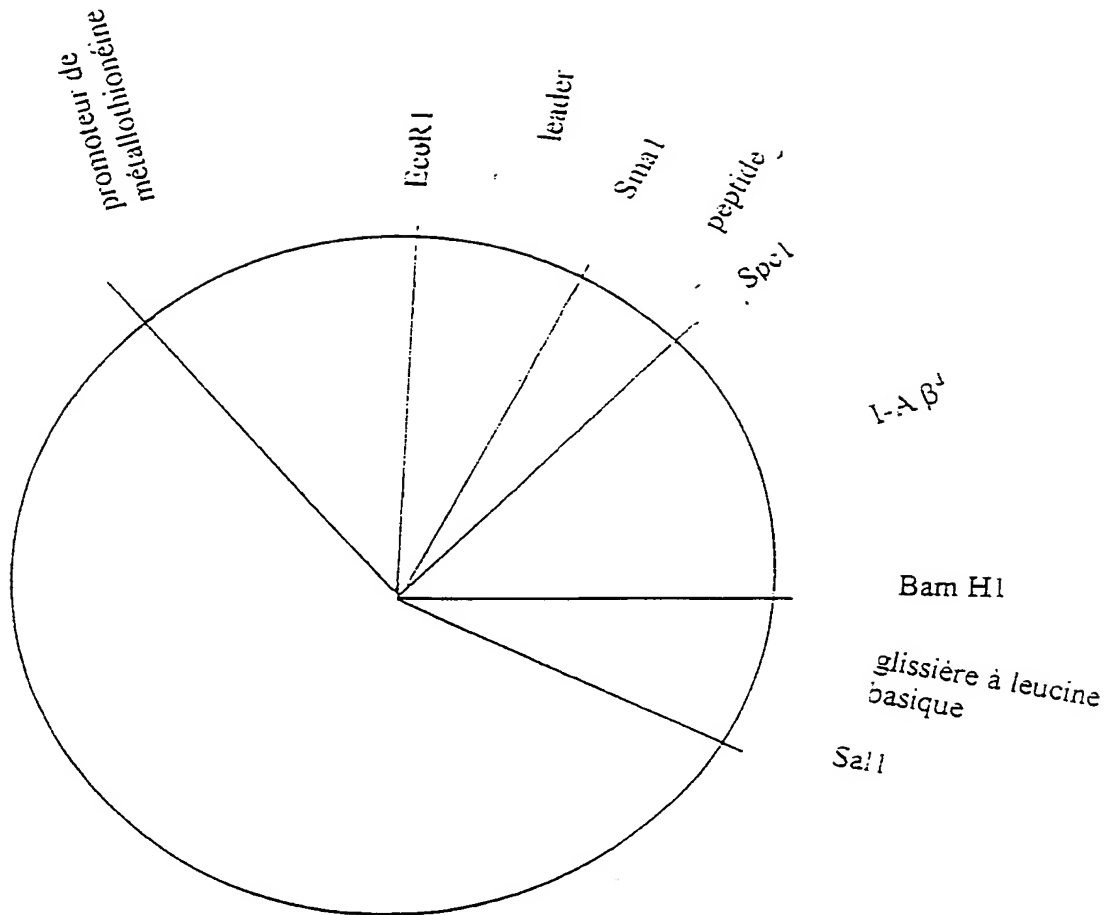


FIGURE 5

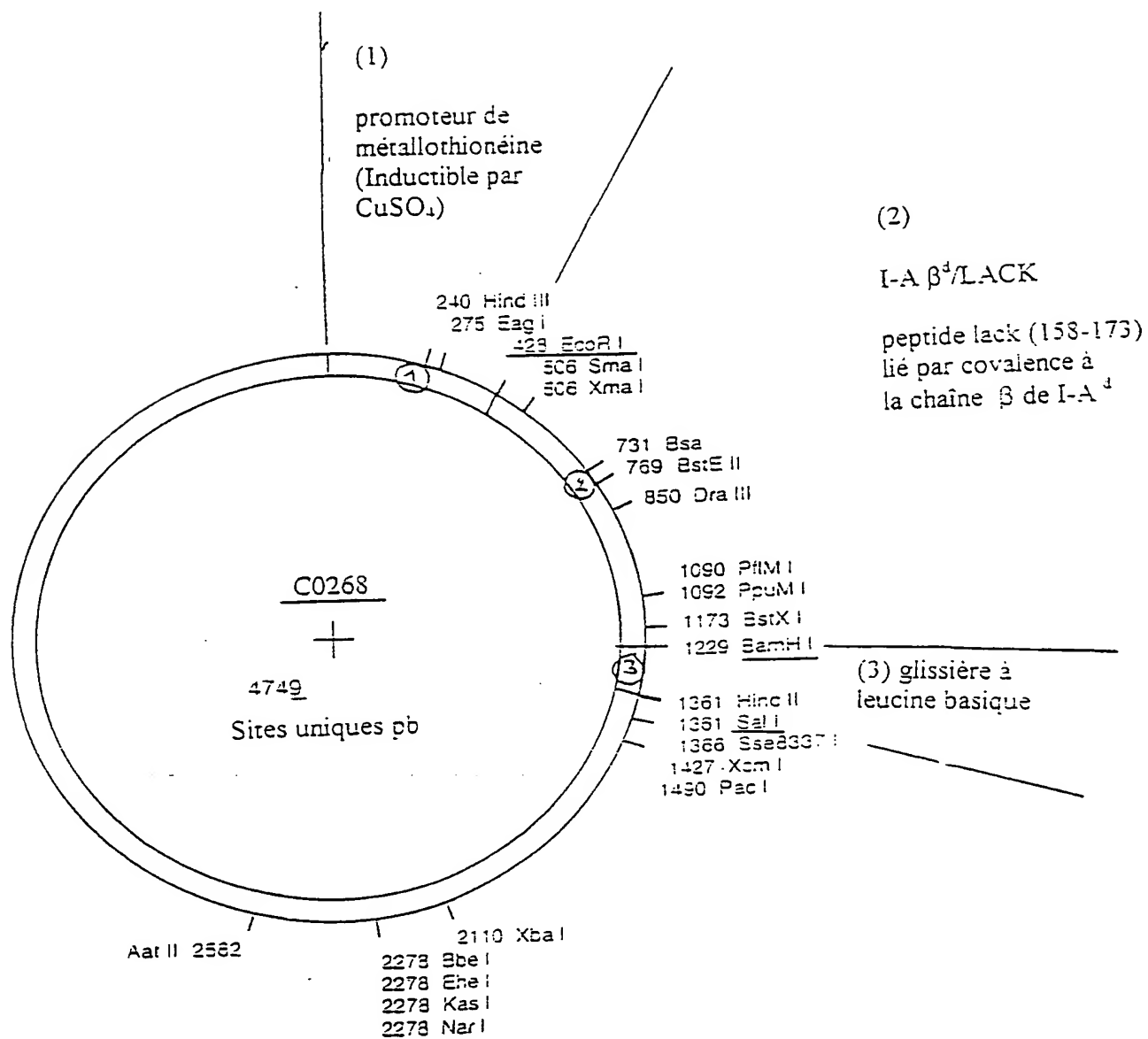
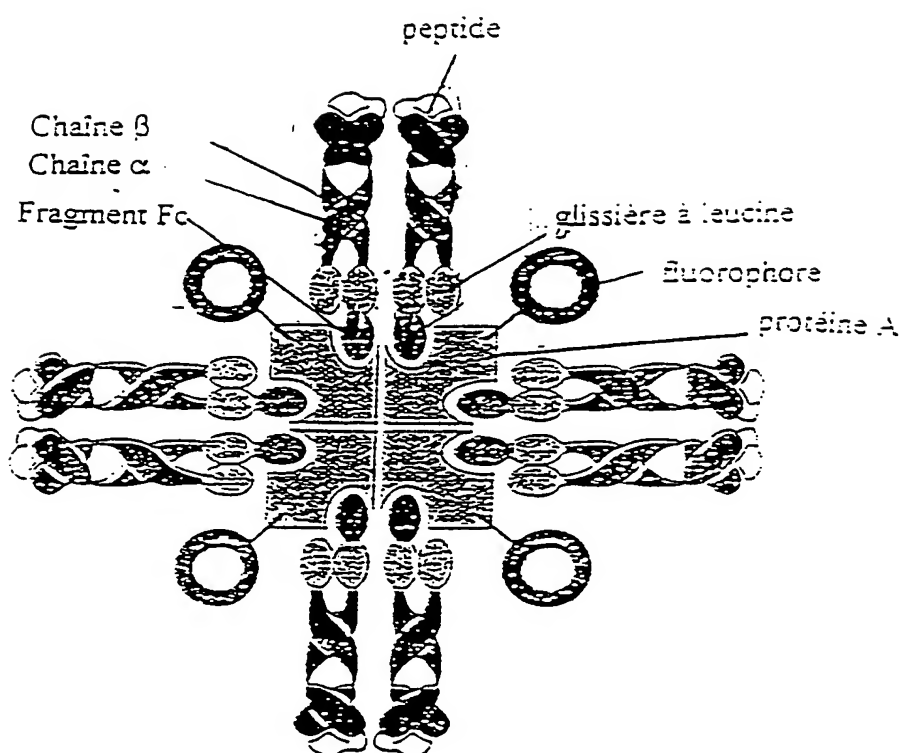


FIGURE 6



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; C.N.R.S.

<120> Protéines recombinantes, et complexes  
moléculaires dérivés de ces protéines,  
analogues à des molécules impliquées dans  
les réponses immunitaires.

&lt;130&gt; CP/BB 1181

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1484

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1482)

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle:ligation  
de fragments d'ADNc

&lt;400&gt; 1

atg ccg tgc agc aga gct ctg att ctg ggg gtc ctc gcc ctg aac acc	48
Met Pro Cys Ser Arg Ala Leu Ile Leu Gly Val Leu Ala Leu Asn Thr	
1 5 10 15	
atg ctc agc ctc tgc gga ggt gaa gac gac att gag gcc gac cac gta	96
Met Leu Ser Leu Cys Gly Gly Glu Asp Asp Ile Glu Ala Asp His Val	
20 25 30	
ggc ttc tat ggt aca act gtt tat cag tct cct gga gac att ggc cag	144
Gly Phe Tyr Gly Thr Thr Val Tyr Gln Ser Pro Gly Asp Ile Gly Gln	
35 40 45	
tac aca cat gaa ttt gat ggt gat gag ttg ttc tat gtg gac ttg gat	192
Tyr Thr His Glu Phe Asp Gly Asp Glu Leu Phe Tyr Val Asp Leu Asp	
50 55 60	
aag aag aaa act gtc tgg agg ctt cct gag ttt ggc caa ttg ata ctc	240
Lys Lys Lys Thr Val Trp Arg Leu Pro Glu Phe Gly Gln Leu Ile Leu	
65 70 75 80	
ttt gag ccc caa ggt gga ctg caa aac ata gct gca gaa aaa cac aac	288
Phe Glu Pro Gln Gly Gly Leu Gln Asn Ile Ala Ala Glu Lys His Asn	
85 90 95	

ttg gga atc ttg act aag agg tca aat ttc acc cca gct acc aat gag	336
Leu Gly Ile Leu Thr Lys Arg Ser Asn Phe Thr Pro Ala Thr Asn Glu	
100 105 110	
gct cct caa gcg act gtg ttc ccc aag tcc cct gtg ctg ctg ggt cag	384
Ala Pro Gln Ala Thr Val Phe Pro Lys Ser Pro Val Leu Leu Gly Gln	
115 120 125	
ccc aac acc ctt atc tgc ttt gtg gac aac atc ttc cca cct gtg atc	432
Pro Asn Thr Leu Ile Cys Phe Val Asp Asn Ile Phe Pro Pro Val Ile	
130 135 140	
aac atc aca tgg ctc aga aat agc aag tca gtc aca gac ggc gtt tat	480
Asn Ile Thr Trp Leu Arg Asn Ser Lys Ser Val Thr Asp Gly Val Tyr	
145 150 155 160	
gag acc agc ttc ctc gtc aac cgt gac cat tcc ttc cac aag ctg tct	528
Glu Thr Ser Phe Leu Val Asn Arg Asp His Ser Phe His Lys Leu Ser	
165 170 175	
tat ctc acc ttc atc cct tct gat gat gac att tat gac tgc aag gtg	576
Tyr Leu Thr Phe Ile Pro Ser Asp Asp Asp Ile Tyr Asp Cys Lys Val	
180 185 190	
gag cac tgg ggc ctg gag gag ccg gtt ctg aaa cac tgg gaa cct gag	624
Glu His Trp Gly Leu Glu Glu Pro Val Leu Lys His Trp Glu Pro Glu	
195 200 205	
att cca gcc ccc atg tca gag ctg aca gaa act gga ggt gga gga tcc	672
Ile Pro Ala Pro Met Ser Glu Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Gly Ser	
210 215 220	
act aca gct cca tca gct cag ctc gaa aaa gag ctc cag gcc ctg gag	720
Thr Thr Ala Pro Ser Ala Gln Leu Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Glu	
225 230 235 240	
aag gaa aat gca cag ctg gaa tgg gag ttg caa gca ctg gaa aag gaa	768
Lys Glu Asn Ala Gln Leu Glu Trp Glu Leu Gln Ala Leu Glu Lys Glu	
245 250 255	
ctg gct cag gca gca tct gag ccc aga ggg ccc aca atc aag ccc tgt	816
Leu Ala Gln Ala Ala Ser Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys	
260 265 270	
cct cca tgc aaa tgc cca gca cct aac ctc ttg ggt gga cca tcc gtc	864
Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val	
275 280 285	
ttc atc ttc cct cca aag atc aag gat gta ctc atg atc tcc ctg agc	912
Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser	
290 295 300	
ccc ata gtc aca tgt gtg gtg gtg gat gtg agc gag gat gac cca gat	960
Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp	
305 310 315 320	
gtc cag atc agc tgg ttt gtg aac aac gtg gaa gta cac aca gct cag	1008
Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln	



325	330	335	
aca caa acc cat aga gag gat tac aac agt act ctc cgg gtg gtc agt			1056
Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser			
340	345	350	
gcc ctc ccc atc cag cac cag gac tgg atg agt ggc aag gag ttc aaa			1104
Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys			
355	360	365	
tgc aag gtc aac aac aaa gac ctc cca gcg ccc atc gag aga acc atc			1152
Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile			
370	375	380	
tca aaa ccc aaa ggg tca gta aga gct cca cag gta tat gtc ttg cct			1200
Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro			
385	390	395	400
cca cca gaa gaa gag atg act aag aaa cag gtc act ctg acc tgc atg			1248
Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met			
405	410	415	
gtc aca gac ttc atg cct gaa gac att tac gtg gag tgg acc aac aac			1296
Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn			
420	425	430	
ggg aaa aca gag cta aac tac aag aac act gaa cca gtc ctg gac tct			1344
Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser			
435	440	445	
gat ggt tct tac ttc atg tac agc aag ctg aga gtg gaa aag aag aac			1392
Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn			
450	455	460	
tgg gtg gaa aga aat agc tac tcc tgt tca gtg gtc cac gag ggt ctg			1440
Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu			
465	470	475	480
cac aat cac cac acg act aag agc ttc tcc cgg act ccg ggt aa			1484
His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly			
485	490		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 921

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle:Ligation  
de fragments d'ADNc

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (921)

&lt;400&gt; 2

atg gct ctg cag atc ccc agc ctc ctc ctc tca gct gct gtg gtg gtg	48
Met Ala Leu Gln Ile Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Val Val	
1 5 10 15	
ctg atg gtg ctg agc agc ccc ggg act gag ggc gga aac tcc atc tgc	96
Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Gly Thr Glu Gly Gly Asn Ser Ile Cys	
20 25 30	
ttc tcg ccg tcg ctg gag cac ccg atc gtg gtg tcc ggc agc tgg gac	144
Phe Ser Pro Ser Leu Glu His Pro Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp	
35 40 45	
gga ggt ggg ggc tca cta gtg ccc cga ggc tct gga ggt gga ggc tcc	192
Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
50 55 60	
gaa agg cat ttc gtg gtc cag ttc aag ggc gag tgc tac tac acc aac	240
Glu Arg His Phe Val Val Gln Phe Lys Gly Glu Cys Tyr Tyr Thr Asn	
65 70 75 80	
ggg acg cag cgc ata cgg ctc gtg acc aga tac atc tac aac cgg gag	288
Gly Thr Gln Arg Ile Arg Leu Val Thr Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu	
85 90 95	
gag tac gtg cgc tac gac agc gac gtg ggc gag tac cgc gcg gtg acc	336
Glu Tyr Val Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr	
100 105 110	
gag ctg ggg cgg cca gac gcc gag tac tgg aac agc cag ccg gag atc	384
Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Pro Glu Ile	
115 120 125	
ctg gag cga acg cgg gcc gag gtg gac acg gcg tgc aga cac aac tac	432
Leu Glu Arg Thr Arg Ala Glu Val Asp Thr Ala Cys Arg His Asn Tyr	
130 135 140	
gag ggg ccg gag acc agc acc tcc ctg cgg cgg ctt gaa cag ccc aat	480
Glu Gly Pro Glu Thr Ser Thr Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Pro Asn	
145 150 155 160	
gtc gcc atc tcc ctg tcc agg aca gag gcc ctc aac cac cac aac act	528
Val Ala Ile Ser Leu Ser Arg Thr Glu Ala Leu Asn His His Asn Thr	
165 170 175	
ctg gtc tgt tcg gtg aca gat ttc tac cca gcc aag atc aaa gtg cgc	576
Leu Val Cys Ser Val Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Lys Ile Lys Val Arg	
180 185 190	
tgg ttc agg aat ggc cag gag gag aca gtg ggg gtc tca tcc aca cag	624
Trp Phe Arg Asn Gly Gln Glu Glu Thr Val Gly Val Ser Ser Thr Gln	
195 200 205	
ctt att agg aat ggg gac tgg acc ttc cag gtc ctg gtc atg ctg gag	672
Leu Ile Arg Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Val Leu Val Met Leu Glu	
210 215 220	
atg acc cct cat cag gga gag gtc tac acc tgc cat gtg gag cat ccc	720
Met Thr Pro His Gln Gly Glu Val Tyr Thr Cys His Val Glu His Pro	

225	230	235	240	
agc ctg aag agc ccc atc act gtg gag tgg agg gca cag tcc gag tct				768
Ser Leu Lys Ser Pro Ile Thr Val Glu Trp Arg Ala Gln Ser Glu Ser				
	245	250	255	
gcc cgg agc aag gga ggt gga gga tcc act aca gct cca tca gct cag				816
Ala Arg Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Ala Pro Ser Ala Gln				
	260	265	270	
ttg aaa aag aaa ttg caa gca ctg aag aaa aag aac gct cag ctg aag				864
Leu Lys Lys Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Asn Ala Gln Leu Lys				
	275	280	285	
tgg aaa ctt caa gcc ctc aag aag aaa ctc gcc cag cat cat cat cat				912
Trp Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Leu Ala Gln His His His His				
	290	295	300	
cat cat tga				921
His His				
305				

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/02193

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 09064 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY OF NEW YORK) 25 February 1999 (1999-02-25) example claims	1-3,6-16
X	WO 97 28191 A (DADE INTERNATIONAL) 7 August 1997 (1997-08-07) examples 2,4-8 claims figure 1C	1-3,5-16
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 3949, 13 September 1999 (1999-09-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 144621, C. CULLEN ET AL.: "A divalent major histocompatibility complex/IgG1 fusion protein induces antigen-specific T cell activation in vitro and in vivo." XP002135726 abstract & CELLULAR IMMUNOLOGY, vol. 192, no. 1, 25 February 1999 (1999-02-25), pages 54-62, New York	1-3,6,7,9-16
Y	A. KALANDADZE ET AL.: "Expression of recombinant HLA-DR2 molecules." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 33, 16 August 1996 (1996-08-16), pages 20156-20162, XP002135710 Baltimore, MD, États-Unis cited in the application abstract figures 1-3	4
Y	J. ALTMAN ET AL.: "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." SCIENCE, vol. 274, no. 5284, 4 October 1996 (1996-10-04), pages 94-96, XP002135711 Washington, DC, États-Unis cited in the application page 94, right-hand column	5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/02193

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>H. KOZONO ET AL.: "Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides." NATURE, vol. 369, no. 6476, 12 May 1994 (1994-05-12), pages 151-154, XP002135712 Londres, Grande Bretagne cited in the application abstract</p>	8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02193

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9806749	A	19-02-1998	AU	4072397 A	06-03-1998
			EP	0935607 A	18-08-1999
WO 9803552	A	29-01-1998	AU	3664597 A	10-02-1998
			EP	0914347 A	12-05-1999
WO 9310220	A	27-05-1993	AU	3220593 A	15-06-1993
WO 9909064	A	25-02-1999	AU	5428598 A	08-03-1999
			EP	1007567 A	14-06-2000
WO 9728191	A	07-08-1997	US	5869270 A	09-02-1999
			AU	2253897 A	22-08-1997
			CA	2244755 A	07-08-1997
			EP	0877760 A	18-11-1998

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

le Internationale No

PCT/FR 00/02193

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/10 G01N33/53  
A61K39/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 06749 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 février 1998 (1998-02-19) le document en entier	1-16
X	WO 98 03552 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 29 janvier 1998 (1998-01-29) le document en entier	1-7, 9-16
X	WO 93 10220 A (ANERGEN, INC.) 27 mai 1993 (1993-05-27) le document en entier	1-3, 6, 7, 9-16
Y	—	4, 5, 8
	—	—

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2200 LA Dordrecht

Fonctionnaire autorisé

# RAPPORT DE P HECHE INTERNATIONALE

le internationale No

PCT/FR 00/02193

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 99 09064 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY OF NEW YORK) 25 février 1999 (1999-02-25) exemple revendications</p>	1-3,6-16
X	<p>WO 97 28191 A (DADE INTERNATIONAL) 7 août 1997 (1997-08-07) exemples 2,4-8 revendications figure 1C</p>	1-3,5-16
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 3949, 13 septembre 1999 (1999-09-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 144621, C. CULLEN ET AL.: "A divalent major histocompatibility complex/IgG1 fusion protein induces antigen-specific T cell activation in vitro and in vivo." XP002135726 abrégé &amp; CELLULAR IMMUNOLOGY, vol. 192, no. 1, 25 février 1999 (1999-02-25), pages 54-62, New York</p>	1-3,6,7, 9-16
Y	<p>A. KALANDADZE ET AL.: "Expression of recombinant HLA-DR2 molecules." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 33, 16 août 1996 (1996-08-16), pages 20156-20162, XP002135710 Baltimore, MD, États-Unis cité dans la demande abrégé figures 1-3</p>	4
Y	<p>J. ALTMAN ET AL.: "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." SCIENCE, vol. 274, no. 5284, 4 octobre 1996 (1996-10-04), pages 94-96, XP002135711 Washington, DC, États-Unis cité dans la demande page 94, colonne de droite</p>	5



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No  
PCT/FR 00/02193

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>H. KOZONO ET AL.: "Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides."  NATURE,  vol. 369, no. 6476,  12 mai 1994 (1994-05-12), pages 151-154,  XP002135712  Londres, Grande Bretagne  cité dans la demande  abrégé</p>	8

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs au nombre de familles de brevets

le internationale No

FR 00/02193

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9806749	A	19-02-1998	AU 4072397 A	06-03-1998
			EP 0935607 A	18-08-1999
WO 9803552	A	29-01-1998	AU 3664597 A	10-02-1998
			EP 0914347 A	12-05-1999
WO 9310220	A	27-05-1993	AU 3220593 A	15-06-1993
WO 9909064	A	25-02-1999	AU 5428598 A	08-03-1999
			EP 1007567 A	14-06-2000
WO 9728191	A	07-08-1997	US 5869270 A	09-02-1999
			AU 2253897 A	22-08-1997
			CA 2244755 A	07-08-1997
			EP 0877760 A	18-11-1998

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

<b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année) 03 mai 2001 (03.05.01)	
<b>Demande internationale no</b> PCT/FR00/02193	<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> CP/AC 59.837
<b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année) 28 juillet 2000 (28.07.00)	<b>Date de priorité</b> (jour/mois/année) 29 juillet 1999 (29.07.99)
<b>Déposant</b> GLAICHENHAUS, Nicolas etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

23 février 2001 (23.02.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

<b>Bureau international de l'OMPI</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	<b>Fonctionnaire autorisé</b> Antonia Muller no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	---


# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 20 NOV 2001

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/AC 59.837-1181		<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02193		Date du dépôt international (jour/mois/année) 28/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 29/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K19/00			
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 10 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 2 feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input checked="" type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 23/02/2001		Date d'achèvement du présent rapport 16.11.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé Perez, C N° de téléphone +49 89 2399 2484	



# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/02193

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

### Description, pages:

1-16 version initiale

### Revendications, N°:

1-11 reçue(s) le 26/10/2001 avec la lettre du 24/10/2001

### Dessins, feuilles:

1/6-6/6 version initiale

### Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-5, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

## RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/02193

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :  
☐ des revendications, n°s :  
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :  
**voir feuille séparée**

### III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.  
☒ les revendications n°s 8-9.

parce que :

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s 8-9, en ce qui concerne l'application industrielle en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :  
**voir feuille séparée**
- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas claires, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02193

international significatif:

- ☐ le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.
- ☐ le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-10
	Non : Revendications 11
Activité inventive	Oui : Revendications 1-10
	Non : Revendications 11
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-7, 10-11
	Non : Revendications

**2. Citations et explications  
voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :  
**voir feuille séparée**

**1. Remarque supplémentaire concernant la partie I (bas de la demande)**

Une liste de séquences a été déposée avec la présente demande. Cette liste de séquences comprend les SEQ N°1 et 2 (pages 1-5).

D'autre part, les modifications des revendications, déposées par le Demandeur avec sa lettre datée du 24.10.2001, sont conformes aux dispositions de l'Article 34(2)(b) PCT et de la Règle 70.2 (c) PCT. Par conséquent, le rapport d'examen préliminaire international est établi sur la base du jeu de revendications 1-11 déposé avec ladite lettre.

**2. Remarque additionnelle concernant la partie III (pas d'opinion)**

Les **revendications 8-9**, correspondant au développement de vaccins et à des utilisations thérapeutiques, englobent sous leur domaine de protection, des méthodes de traitement thérapeutique ou diagnostique appliquées au corps humain ou animal (Règle 67.1(iv) PCT). Par conséquent, aucune opinion concernant l'application industrielle des objets de ces revendications n'est donnée (Article 34(4)(a)(i) PCT).

**3. Remarques supplémentaires concernant la partie V (déclaration motivée selon la règle 66.2(a) (ii) concernant la nouveauté, l'activité inventive et l'applicabilité industrielle)****3.1 Présente demande**

La présente demande concerne la préparation de protéines recombinantes solubles comportant au moins un dimère, formé des chaînes alpha et/ou bêta des molécules de classe I ou II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Ces chaînes sont caractérisées par les éléments suivants:

- la présence, à l'extrémité carboxyterminale d'au moins l'une de ces deux chaînes, de toute ou une partie de la région Fc d'une immunoglobuline (Ig),
- elles sont associées entre elles en plusieurs dimères, par exemple, sous la forme d'octamères,
- elles sont complexées à des protéines naturelles ou artificielles, comportant plusieurs sites de liaison pour les régions constantes des immunoglobulines comme la protéine A ou G.

Lesdites protéines solubles ont de nombreuses applications diagnostiques ou thérapeutiques, car elles permettent d'analyser, puis d'utiliser, la population de lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné.



**3.2 Documents de l'art antérieur**

Les documents suivants sont considérés comme étant pertinents pour l'analyse de la nouveauté et de l'activité inventive de l'objet revendiqué. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure:

**D1: WO-A-9909064**

**D2: WO-A-9806749**

**D3: WO-A-9803552**

**D4: WO-A-9728191**

**D5: WO-A-9310220**

**D6: A. KALANDADZE ET AL., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 33, 1996, pages 20156-20162**

**D7: H. KOZONO ET AL., NATURE, vol. 369, no. 6476, 1994, pages 151-154**

**D8: J. ALTMAN ET AL., SCIENCE, vol. 274, no. 5284, 1996, pages 94-96**

- (i) **D1** présente des protéines de fusion chimériques, recombinantes et solubles (DEF p.6) comprenant un épitope, au moins deux éléments du CMH de classe II et la région constante d'une Ig (Fc). Chaque élément du CMH comprend 2 chaînes comportant les domaines extracellulaires du CMH (p.3, l.22-28 et p.26-32, revendications). D1 cite en exemple la production par génie génétique et la purification d'un dimère soluble de la molécule chimérique HA110-120/I-E<sup>d</sup> alpha beta/Fc gamma2a (p.13, l.15 - p.14, l.17 et p.19, l.13-18), comportant les régions "hinge", CH2 et CH3 d'une IgG2a à l'extrémité carboxyterminale de la chaîne beta de la molécule IE<sup>d</sup> (Figures 2 A et B). La séquence nucléotidique du peptide HA110-120 est insérée dans la séquence de la molécule chimérique par l'intermédiaire d'un "peptide linker". Le même exemple présente la séquence polynucléotidique, le vecteur d'expression et les cellules hôtes de ce vecteur, ainsi que les activités dudit dimère. Par exemple, ce dimère est capable de reconnaître la population de lymphocytes T spécifiques du peptide présenté par le dimère, et d'induire la lyse médiée par le complément de ces lymphocytes T spécifiques (p.13, l.15 - p.20, l.2). D1 présente également les nombreuses applications desdites protéines en thérapie et diagnostic (par exemple, dans le résumé).
- (ii) **D2** décrit la préparation de protéines recombinantes solubles et multimériques comprenant les chaînes alpha et beta des molécules du CMH de Classe II. En particulier, D2 présente une méthode de préparation de protéines de fusion DR2-IgG

bivalentes, où le domaine Fc d'une IgG2a est fusionné à l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne alpha du DR (p.39, l.13 - p.40, l.24, et commentaires de la Figure 2 p.9, l.6-24). Des méthodes similaires permettent de préparer des multimères de ces protéines de fusion, qui permettent d'augmenter l'affinité desdits complexes vis à vis de leur récepteur cible sur les lymphocytes T (TCR) (p.42, l.27- p.43, l.2):

- les tétramères "DR2-tétramères", où une chaîne de DR2 est biotinylée, ce qui permet l'association des protéines de fusion en tétramères sur la streptavidine (p.40, l.24 - p.42, l.26)

- les DR2-IgM, qui peuvent être considérés comme résultant de l'association de 5 IgM monomériques (p.42, l.27 - p.43, l.30).

La séquence nucléotidique de DR2-IgG est donnée page 49. Les vecteurs d'expression et hôte cellulaire sont décrits page 40, lignes 3-24. Ces protéines de fusion comportent également les glissières à leucine de Fos et Jun et peuvent être liées à un peptide immunogénique (p.42, l.3-10). Leurs utilisations pour le criblage des lymphocytes T spécifiques, utilisés ensuite en diagnostic et thérapie sont décrites (D2: p.7, l.15 - p.8, l.25).

(iii) **D3** décrit des protéines de fusion solubles comprenant plusieurs molécules du CMH, dont deux au moins sont identiques, liées par un "linker" et portant un peptide. Ledit linker peut être un gène codant pour les régions charnières, CH1 et CH2 de la chaîne lourde d'une IgG permettant de délivrer un second signal aux cellules cibles, ou une glissière à leucine (p.2, l.22 - p.3, l.32). Le peptide peut être incorporé à la séquence nucléotidique codant pour la protéine de fusion ou simplement lié de manière non covalente à la molécule du CMH ("loaded"). Par exemple, l'exemple 1 présente la génération d'un homodimère soluble comprenant les régions "Hinge", CH2 et CH3 d'une IgG1, les domaines extracellulaires alpha 1, 2 et 3 de la molécule du CMH de classe I (H-2K<sup>b</sup>) et la chaîne Beta2 microglobulin, ainsi que sa capacité à activer la population de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'antigène présenté (p.4, l.25 - p.6, l.24). D3 montre également la préparation d'un dimère IAq/IgG3 (p.6, l.25 - p.7, l.36).

(iv) **D4** présente des complexes de molécules du CMH, en particulier de complexe lié à une Ig. L'exemple 2 (p. 49-55) décrit la préparation d'un complexe soluble dont la structure est proche de celle d'une Ig (Figure 1C), comprenant les chaînes alpha et beta d'une molécule du CMH de classe II, les domaines constants d'une Ig et le

peptide d'intérêt lié à la chaîne beta. Les effets in vivo et in vitro de ce complexe sur la population de lymphocytes T spécifiques de l'antigène présenté sont montrés dans les exemples 4 à 8 (p.58-67).

- (v) **D5** décrit la prep de protéines chimères formées des domaines extracellulaires des molécules de classe II du CMH liées à une IgG. En particulier, D6 cite l'exemple d'un chimère où les extrémités carboxyterminales des chaînes alpha et beta de la protéine du CMH sont liées aux régions constantes des chaînes lourdes et légères d'une IgG respectivement, ce qui lui confèrent une structure dimérique (p.10, l.1-11 et Figure 2). La séquence polynucléotidique, le vecteur d'expression et les cellules hôtes de ce vecteur sont décrits dans l'exemple 1 (p.28, l.14-p.30, l.9), les applications desdites protéines en thérapie et diagnostic le sont page 3, l.33-36.
- (vi) **D6** montre qu'il est possible de faire présenter efficacement un peptide antigénique par une protéine soluble du CMH, en liant le peptide, par génie génétique, à l'extrémité amino-terminale de la chaîne beta de la protéine du CMH. La séquence liante est un "linker" codant un bras peptidique flexible (résumé).
- (vii) **D7** montre que le remplacement, dans des molécules solubles du CMH, des régions transmembranaires des chaînes alpha et beta par des glissières à leucine favorise l'appariement de ces chaînes (résumé).
- (viii) **D8** soulève le problème de la vitesse de dissociation des complexes peptide-CMH solubles de leur récepteur TCR à la surface des lymphocytes T spécifiques (p.94, 2ème col). La solution à ce problème proposée dans D8 est de préparer des tétramères de ces complexes en biotinyant le peptide et en associant les complexes en tétramères par l'intermédiaire de la streptavidine, qui possède 4 sites de fixation pour la biotine (p.8, 3ème col.).

### **3.3 Déclaration quant à la nouveauté et à l'activité inventive (Articles 33 (2) et (3) PCT)**

Les arguments du demandeur, donnés dans sa lettre du 24.10.2001 répondant à notre opinion écrite préliminaire ont été pris en considération lors de l'établissement de ce rapport, mais sont considérés comme non pertinents pour les objections présentées ci-dessous.

### **3.31 Revendication 11**

L'objet de la **revendication 11** ne remplit pas les conditions énoncées dans les Articles 33 (2) et (3) PCT, car ladite revendication n'est pas nouvelle au vu des documents D1, D2 et D4.

En effet, D1 décrit une population de lymphocytes T transgéniques purifiés exprimant le TCR 14-3-1, et reconnaissant un antigène donné, le complexe HA110-120/I-E<sup>d</sup> (D1: p.18, l.13-15). Cette population purifiée de lymphocytes T spécifiques d'un antigène convient à une utilisation en thérapie cellulaire (voir la Gazette du PCT, Section IV, Chapter III-4.8). Par conséquent, comme l'objet de la revendication 11 ne comprend aucune caractéristique essentielle qui permette de le distinguer de la population de lymphocytes T enrichie décrite dans D1, ladite population de D1 est préjudiciable à la nouveauté de la revendication 11. La même objection de nouveauté est soulevée au vu de D2, qui présente une population de lymphocytes T réactifs vis à vis d'un complexe MHC-peptide purifiés par un trieur de cellules activées par fluorescence (D2: p.7, l.20-22) et de D4, qui décrit un clone de lymphocytes T, K68-36, spécifiques de l'antigène NP 404-415/DR1 (D4: p.62, 14-18).

### **3.32 Revendications 1-10**

Les **revendications 1-10** satisfont les conditions énoncées dans les Articles 33 (2) et (3) PCT, car lesdites revendications sont nouvelles et inventives.

En effet, aucun des documents de l'art antérieur disponible ne décrit ou ne suggère les protéines recombinantes solubles telles que définies dans la revendication 1. Par conséquent, l'objet des revendications 1-10 est nouveau vis à vis de l'art antérieur disponible.

### **3.4 Déclaration quant à l'application industrielle (Articles 33 (4) PCT)**

Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les **revendications 8-9** sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un

médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

**4. Remarques supplémentaires concernant la partie VIII (Article 6 PCT)**

**4.1 Revendication 1**

**La revendication 1** ne satisfait pas aux conditions requises par l'**Article 6 PCT**, car la revendication n'est pas clairement formulée. L'IPEA considère que les caractéristiques essentielles des chaînes des protéines de la revendication 1, en particulier le fait qu'elles soient associées en dimères et complexées à certaines protéines, sont "perdues" au milieu de caractéristiques optionnelles. La présence de d'expressions comme "le cas échéant" et "notamment" rend donc l'objet de la revendication 1 ambigu. L'IPEA recommande de supprimer ces caractéristiques optionnelles de l'objet de la revendication 1 et de les réintroduire sous la forme d'objet de revendications dépendantes, au moment de la phase régionale d'examen (voir la Gazette du PCT, Section IV, Chapitre III-4.6).

**4.2 Revendication 10**

La revendication 10 n'est pas claire dans le sens de l'**Article 6 PCT**, car elle est dirigée sur "l'utilisation selon la revendication 2 ou 3", alors que lesdites revendications sont des revendications de produits. La correcte référence semble être la revendication 7.

5

REVENDICATIONS

1/ Protéines recombinantes solubles, constituées au minimum d'un dimère lui-même formé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules du CMH de classe I ou II, comportant à l'extrémité carboxy-terminale de l'une ou des 2 chaînes, tout ou partie d'une région Fc d'une immunoglobuline, ces chaînes comportant le cas échéant des glissières à leucine, caractérisées en ce qu'elles sont associées en plusieurs dimères et notamment en tétramère ou en octamères et sont complexées à des protéines naturelles ou artificielles, comportant plusieurs sites de liaison pour les régions constantes des immunoglobulines, telles que la protéine A ou la protéine G.

2/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont liées de manière covalente ou non covalente à un peptide antigénique.

3/ Protéines recombinantes solubles selon la revendication 2, caractérisées en ce que le peptide antigénique est fixé à l'extrémité amino-terminale de la chaîne  $\beta$  par l'intermédiaire d'un bras flexible.

4/ Séquences nucléotidiques possédant un cadre de lecture correspondant à tout ou partie d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5/ Vecteurs d'expression, notamment plasmides, caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence selon la revendication 4.

6/ Cellules procaryotes ou eucaryotes porteuses d'au moins un vecteur selon la revendication 5.

5 7/ Utilisation des protéines selon la revendication 2 ou 3, pour dénombrer et/ou purifier les lymphocytes T réagissant avec un antigène donné et pour caractériser le phénotype de ces cellules.

10 8/ Utilisation selon la revendication 7, comme protéines immunostimulantes, notamment pour le développement de vaccins.

15 9/ Utilisation selon la revendication 7, comme moyen prédictif de l'état d'un patient pour dénombrer et déterminer le phénotype de cellules T autoréactives chez des malades à risques, ou à des fins thérapeutiques.

10/ Utilisation selon la revendication 2 ou 3, pour la purification et/ou l'enrichissement de lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné, soit à partir de cultures cellulaires, soit à partir de prélèvements sur un patient.

20 11/ Populations de lymphocytes T enrichies en un type de cellules T donné, telles qu'obtenues selon la revendication 10, caractérisées en ce qu'elles sont destinées à être utilisées à des fins de thérapie cellulaire.

## PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>CP/AC 59.837</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 00/ 02193</b>	Date du dépôt international(jour/mois/année) <b>28/07/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>29/07/1999</b>
Déposant  <b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 5 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

## 1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

## 4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

## 5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

## 6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

/FR 00/02193

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/10 G01N33/53  
A61K39/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 06749 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 février 1998 (1998-02-19) le document en entier ---	1-16
X	WO 98 03552 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 29 janvier 1998 (1998-01-29) le document en entier ---	1-7, 9-16
X	WO 93 10220 A (ANERGEN, INC.) 27 mai 1993 (1993-05-27) le document en entier ---	1-3, 6, 7, 9-16
Y	---	4, 5, 8
	--- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 09064 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY OF NEW YORK) 25 février 1999 (1999-02-25) exemple revendications ---	1-3, 6-16
X	WO 97 28191 A (DADE INTERNATIONAL) 7 août 1997 (1997-08-07) exemples 2, 4-8 revendications figure 1C ---	1-3, 5-16
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 3949, 13 septembre 1999 (1999-09-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 144621, C. CULLEN ET AL.: "A divalent major histocompatibility complex/IgG1 fusion protein induces antigen-specific T cell activation in vitro and in vivo." XP002135726 abrégé & CELLULAR IMMUNOLOGY, vol. 192, no. 1, 25 février 1999 (1999-02-25), pages 54-62, New York ---	1-3, 6, 7, 9-16
Y	A. KALANDADZE ET AL.: "Expression of recombinant HLA-DR2 molecules." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 33, 16 août 1996 (1996-08-16), pages 20156-20162, XP002135710 Baltimore, MD, États-Unis cité dans la demande abrégé figures 1-3 ---	4
Y	J. ALTMAN ET AL.: "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." SCIENCE, vol. 274, no. 5284, 4 octobre 1996 (1996-10-04), pages 94-96, XP002135711 Washington, DC, États-Unis cité dans la demande page 94, colonne de droite ---	5
	---	
	-/--	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>H. KOZONO ET AL.: "Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides." NATURE, vol. 369, no. 6476, 12 mai 1994 (1994-05-12), pages 151-154, XP002135712 Londres, Grande Bretagne cité dans la demande abrégé</p> <p>-----</p>	8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02193

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
W0 9806749	A	19-02-1998	AU	4072397 A	06-03-1998
			EP	0935607 A	18-08-1999
W0 9803552	A	29-01-1998	AU	3664597 A	10-02-1998
			EP	0914347 A	12-05-1999
W0 9310220	A	27-05-1993	AU	3220593 A	15-06-1993
W0 9909064	A	25-02-1999	AU	5428598 A	08-03-1999
			EP	1007567 A	14-06-2000
W0 9728191	A	07-08-1997	US	5869270 A	09-02-1999
			AU	2253897 A	22-08-1997
			CA	2244755 A	07-08-1997
			EP	0877760 A	18-11-1998

10107-8116 /

**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference CP/AC 59.837	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02193	International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)	Priority date (day/month/year) 29 July 1999 (29.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 19/00		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>10</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 23 February 2001 (23.02.01)	Date of completion of this report 16 November 2001 (16.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02193

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-16 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 1-11 \_\_\_\_\_, filed with the letter of 24 October 2001 (24.10.2001)
- ☒ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ 1/6 - 6/6 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-5 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02193

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 8-9

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 8-9  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See separet sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

1. A list of sequences was submitted with the present application. This list of sequences includes SEQ N<sup>os</sup> 1 and 2 (pages 1-5).

Furthermore, the amended claims filed by the applicant with the letter of 24 October 2001 satisfy the requirements of PCT Article 34(2)(b) and PCT Rule 70.2(c). Consequently, the international preliminary examination report has been written on the basis of the set of Claims 1-11 filed with that letter.



**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box III

2. **Claims 8-9**, concerning the development of vaccines and therapeutic uses, include within their scope of protection therapeutic treatment or diagnostic methods applied to the human or animal body (PCT Rule 67.1(iv)). Consequently, no opinion has been given as to the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/02193

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims	11	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10	YES
	Claims	11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 10-11	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

### 3. Further observations concerning Box V

#### 3.1 Present application

The present application concerns the production of soluble recombinant proteins comprising at least one dimer consisting of  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains of Class I or Class II molecules of the Major Histocompatibility Complex (MHC). These chains are characterised by the following features:

- the presence of all or part of the Fc region of an immunoglobulin (Ig) at the carboxy-terminal end of at least one of these two chains;
- they are assembled together as several dimers, in the form of octamers, for example;
- they form complexes with natural or artificial proteins, having several binding sites for the constant regions of immunoglobulins such as the A and G proteins.

These soluble proteins have numerous diagnostic and therapeutic uses, since they enable the population of antigen-specific T lymphocytes to be analysed and then used.

### 3.2 Prior Art Documents

The following documents are considered to be relevant to the assessment of the novelty and inventive step of the claimed subject matter. The document numbering used below shall be retained throughout the procedure:

- D1: WO-A-99/09064
- D2: WO-A-98/06749
- D3: WO-A-98/03552
- D4: WO-A-97/28191
- D5: WO-A-93/10220
- D6: A. KALANDADZE ET AL., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 271, N° 33, 1996, pages 20156-20162
- D7: H. KOZONO ET AL., NATURE, Vol. 369, N° 6476, 1994, pages 151-154
- D8: J. ALTMAN ET AL., SCIENCE, Vol. 274, N° 5284, 1996, pages 94-96.

- (i) D1 describes soluble recombinant chimeric fusion proteins (DEF, page 6) comprising an epitope, at least two MHC Class II elements and the constant region of an Ig (Fc). Each MHC element comprises two chains containing the extracellular domains of the MHC (page 3, lines 22-28; pages 26-32; claims). As an example, D1 mentions the genetically engineered production and purification of a soluble dimer of the chimeric molecule HA110-120/I-E<sup>d</sup>αβ/Fcγ2a (page 13, line 15, to page 14, line 17; and page 19, lines 13-18) having the hinge region, the CH2 region and the CH3 region of an IgG2a at the carboxy-terminal end of the β chain of the IE<sup>d</sup> molecule (Figures 2A and B). The nucleotide sequence of the peptide HA110-120 is inserted into the sequence of the chimeric molecule by means of a peptide linker. That same example describes the polynucleotide sequence, the expression vector and the host cells of

the vector, as well as the activities of the said dimer. For instance, this dimer is capable of recognising the population of T lymphocytes specific to the peptide presented by the dimer, and of inducing lysis mediated by the complement of these specific T lymphocytes (page 13, line 15, to page 20, line 2). D1 also describes numerous therapeutic and diagnostic uses of these proteins (in the summary, for example).

- (ii) D2 describes the production of soluble multimer recombinant proteins comprising the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of MHC Class II molecules. In particular, D2 describes a method for producing bivalent DR2-IgG fusion proteins in which the Fc domain of an IgG2a is fused to the carboxy-terminal end of the DR  $\alpha$  chain (page 39, line 13, to page 40, line 24; observations concerning Figure 2 on page 9, lines 6-24). Similar methods can be used to produce multimers of these fusion proteins, which enable the affinity of the said complexes for the target T cell receptor (TCR) to be increased (page 42, line 27, to page 43, line 2):

- DR2-tetramers, in which a DR2 chain is biotinylated, enabling the fusion proteins to be combined as tetramers on streptavidin (page 40, line 24, to page 42, line 26);
- DR2-IgMs, which can be considered as resulting from the combination of 5 monomeric IgMs (page 42, line 27, to page 43, line 30).

The nucleotide sequence of DR2-IgG is provided on page 49. The expression vectors and host cell are described on page 40, lines 3-24. These fusion proteins also contain the Fos and Jun leucine zipper domains and can be bonded to an immunogenic peptide (page 42, lines 3-10). Their uses for screening specific T cells, which are then used for diagnosis and therapy, are described

(D2: page 7, line 15, to page 8, line 25).

(iii) D3 describes soluble fusion proteins comprising several MHC molecules, of which at least two are identical, bonded by a linker and containing a peptide. The said linker can be a gene encoding the hinge, CH1 and CH2 regions of the heavy chain of an IgG, enabling a second signal to be sent to the target cells, or a leucine zipper (page 2, line 22, to page 3, line 32). The peptide may be incorporated in the nucleotide sequence encoding the fusion protein or simply bonded non-covalently to the MHC molecule (loaded). For instance, Example 1 shows the production of a soluble homodimer containing the hinge, CH2 and CH3 regions of an IgG1, the  $\alpha$ 1, 2 and 3 extracellular domains of the MHC Class I molecule (H-2K<sup>E</sup>) and the  $\beta$ 2 microglobulin chain, and also describes its ability to activate the population of cytotoxic T cells specific to the antigen presented (page 4, line 25, to page 6, line 24). D3 also shows the production of an IAq/IgG3 dimer (page 6, line 25, to page 7, line 36).

(iv) D4 describes MHC molecule complexes, and particularly complexes linked to an Ig. Example 2 (pages 49-55) describes the production of a soluble complex with a structure similar to that of an Ig (Figure 1C), comprising the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of an MHC Class II molecule, the constant regions of an Ig and the peptide of interest linked to the  $\beta$  chain. The effects of this complex, *in vivo* and *in vitro*, on the population of T cells specific to the antigen presented are shown in Examples 4-8 (pages 58-67).

(v) D5 describes the production of chimeric proteins made from the extracellular domains of MHC Class II

molecules linked to an IgG. In particular, D5 mentions the example of a chimera in which the carboxy-terminal ends of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of the MHC protein are linked to the constant regions of the heavy and light chains of an IgG, respectively, thus giving it a dimeric structure (page 10, lines 1-11; Figure 2). The polynucleotide sequence, the expression vector and the host cells of the vector are described in Example 1 (page 28, line 14, to page 30, line 9); the therapeutic and diagnostic uses of the said proteins are described on page 3, lines 33-36.

- (vi) D6 shows that it is possible to make a soluble MHC protein efficiently present an antigenic peptide by linking the peptide, using genetic engineering, to the amino terminal end of the  $\beta$  chain of the MHC protein. The linking sequence is a linker encoding a flexible peptide arm (summary).
- (vii) D7 shows that the replacement, in soluble MHC molecules, of the transmembrane regions of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains by leucine zippers promotes the pairing of these chains (summary).
- (viii) D8 raises the problem of the rate at which soluble peptide-MHC complexes dissociate from their TCR receptor on the surface of specific T cells (page 94, 2<sup>nd</sup> column). The solution to this problem put forward in D8 is to produce tetramers of these complexes by biotinylating the peptide and combining the complexes as tetramers using streptavidin, which has 4 biotin-binding sites (page 8, 3<sup>rd</sup> column).

### 3.3 Statement with regard to novelty and inventive step (PCT Article 33(2) and (3))

The arguments put forward in the applicant's letter of 24 October 2001 in response to the preliminary written opinion have been taken into account in writing this report but are considered to be irrelevant to the objections raised below.

#### 3.31 Claim 11

The subject matter of Claim 11 does not meet the requirements of PCT Articles 33(2) and (3), because this claim is not novel in relation to D1, D2 and D4.

Indeed, D1 describes a population of purified transgenic T cells expressing TCR 14-3-1 and recognising a particular antigen: the HA110-120/I-E<sup>d</sup> complex (D1: page 18, lines 13-15). This purified population of antigen-specific T cells is suitable for use in cell therapy (see PCT Examination Guidelines, Chapter III-4.8). Consequently, since the subject matter of Claim 11 contains no essential feature distinguishing it from the enriched population of T cells described in D1, the said population of D1 deprives Claim 11 of novelty. The same novelty objection applies in connection with D2, which describes a population of T cells reactive with an MHC-peptide complex which are purified by a fluorescence-activated cell sorter (D2: page 7, lines 20-22), and in connection with D4, which describes a clone of T cells K68-36, which are specific to the antigen NP 404-

415/DR1 (D4: page 62, lines 14-18).

### 3.32 Claims 1-10

Claims 1-10 satisfy the requirements of PCT Article 33(2) and (3), because these claims are novel and inventive.

Indeed, none of the available prior art documents either describes or suggests the soluble recombinant proteins defined in Claim 1. Consequently, the subject matter of Claims 1-10 is novel in relation to the available prior art.

### 3.4 Statement with regard to industrial applicability (PCT Article 33(4))

There are no uniform criteria in the PCT Contracting States for determining whether Claims 8-9 are industrially applicable. Patentability may also depend on the wording of the claims. Thus, the European Patent Office does not consider the subject matter of claims to the medical use of a compound to be industrially applicable. However, claims to a known compound, for a first medical use, will be accepted, as will claims to the use of such a compound for producing a drug with a view to a novel medical treatment.



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**4. PCT Article 6****4.1 Claim 1**

Claim 1 does not meet the requirements of PCT Article 6 because the claim is not clearly worded. The IPEA considers that the essential features of the protein chains of Claim 1, and particularly the fact that they are assembled as dimers and complexed with certain proteins, are "lost" in the midst of optional features. The presence of expressions such as "if required" and "particularly" renders the subject matter of Claim 1 ambiguous. The IPEA recommends that these optional features be deleted from Claim 1 and reincorporated as the subject matter of dependent claims on entry into the regional examination phase (see PCT Examination Guidelines, Chapter III-4.6).

**4.2 Claim 10**

Claim 10 is not clear within the meaning of PCT Article 6, because it is directed at the "use as per Claim 2 or 3", whereas these claims are product claims. The correct reference would appear to be to Claim 7.

REPLACED BY  
ART 34 AMDT

CLAIMS

1. Soluble recombinant proteins, constituted as a minimum from a dimer that is itself formed from  $\alpha$  and  $\beta$  chains of class I or II MHC molecules, characterized in that they comprise at the carboxy-terminal end of one or both chains, the whole or part of an Fc region of an immunoglobulin.

2. Soluble recombinant proteins according to claim 1, characterized in that they comprise all or part of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of MHC molecules.

3. Soluble recombinant proteins according to claim 1 or 2, characterized in that they comprise all or part of the CH2 and/or CH3 area of the Fc region.

4. Soluble recombinant proteins according to any one of claims 1 to 3, characterized in that the chains which constitute the dimer comprise leucine zippers.

5. Soluble recombinant proteins according to any one of claims 1 to 4, characterized in that they are combined in several dimers and in particular in tetramers or in octamers.

6. Soluble recombinant proteins according to any one of claims 1 to 5, characterized in that they are complexed with natural or artificial proteins, comprising several binding sites for the constant regions of immunoglobins such as protein A, protein G or receptor multimers of the Fc regions obtained by genetic recombination.

7. Soluble recombinant proteins according to any one of claims 1 to 6, characterized in that they are bound covalently or noncovalently to an antigenic peptide.

8. Soluble recombinant proteins according to claim 7, characterized in that the antigenic peptide is fixed to the

amino-terminal end of the  $\beta$  chain by means of a flexible arm.

9. Nucleotide sequences possessing a reading frame corresponding to all or part of a protein according to any  
5 one of claims 1 to 8.

10. Expression vectors, in particular plasmids, characterized in that they have a sequence according to claim 9.

11. Prokaryotic or eukaryotic cells carrying at least  
10 one vector according to claim 10.

12. Use of proteins according to claim 7 or 8, for counting and/or purifying the T lymphocytes that react with a given antigen and for characterizing the phenotype of these cells.

13. Use according to claim 12, as immunostimulating proteins, in particular for the development of vaccines.

14. Use according to claim 12, as a means of predicting a patient's condition, for counting and determining the phenotype of autoreactive T cells in patients at risk, or  
20 for therapeutic purposes.

15. Use of proteins according to claim 7 or 8, for the purification and/or enrichment of specific T lymphocytes of a given antigen, either from cell cultures, or from samples taken from a patient.

16. Use according to claim 15, characterized in that  
25 the populations of T lymphocytes enriched with a given type of T cells, are used for the purposes of cellular therapy.

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 580931  
FR 9909862

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
1	X WO 98 06749 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 février 1998 (1998-02-19) * le document en entier *	1-16
2	X WO 98 03552 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 29 janvier 1998 (1998-01-29) * le document en entier *	1-7, 9-16
3	X WO 93 10220 A (ANERGEN, INC.) 27 mai 1993 (1993-05-27) * le document en entier *	1-3, 6, 7, 9-16
	Y	4, 5, 8
4	X WO 99 09064 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY OF NEW YORK) 25 février 1999 (1999-02-25) * exemple * * revendications *	1-3, 6-16
5	X WO 97 28191 A (DADE INTERNATIONAL) 7 août 1997 (1997-08-07) * exemples 2, 4-8 * * revendications * * figure 1C *	1-3, 5-16
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
		C07K
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 avril 2000		Nooij, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 580931  
FR 9909862

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
6 X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 3949, 13 septembre 1999 (1999-09-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 144621, C. CULLEN ET AL.: "A divalent major histocompatibility complex/IgG1 fusion protein induces antigen-specific T cell activation in vitro and in vivo." XP002135726 * abrégé * & CELLULAR IMMUNOLOGY, vol. 192, no. 1, 25 février 1999 (1999-02-25), pages 54-62, New York	1-3, 6, 7, 9-16
7 D,Y	A. KALANDADZE ET AL.: "Expression of recombinant HLA-DR2 molecules." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 33, 16 août 1996 (1996-08-16), pages 20156-20162, XP002135710 Baltimore, MD, États-Unis * abrégé * * figures 1-3 *	4
8 D,Y	J. ALTMAN ET AL.: "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." SCIENCE, vol. 274, no. 5284, 4 octobre 1996 (1996-10-04), pages 94-96, XP002135711 Washington, DC, États-Unis * page 94; colonne de droite * --- -/--	5
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 avril 2000		Noij, F
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 580931  
FR 9909862

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
9 D,Y	H. KOZONO ET AL.: "Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides." NATURE, vol. 369, no. 6476, 12 mai 1994 (1994-05-12), pages 151-154, XP002135712 Londres, Grande Bretagne * abrégé *	8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 avril 2000		Nooij, F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO.**

FA 580931  
FR 9909862

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

13-04-2000

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9806749 A	19-02-1998	AU 4072397 A	06-03-1998
		EP 0935607 A	18-08-1999
WO 9803552 A	29-01-1998	AU 3664597 A	10-02-1998
		EP 0914347 A	12-05-1999
WO 9310220 A	27-05-1993	AU 3220593 A	15-06-1993
WO 9909064 A	25-02-1999	AU 5428598 A	08-03-1999
WO 9728191 A	07-08-1997	US 5869270 A	09-02-1999
		AU 2253897 A	22-08-1997
		CA 2244755 A	07-08-1997
		EP 0877760 A	18-11-1998

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/02193

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/10 G01N33/53  
A61K39/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, STRAND

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 06749 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 février 1998 (1998-02-19) le document en entier	1-16
X	WO 98 03552 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 29 janvier 1998 (1998-01-29) le document en entier	1-7, 9-16
X	WO 93 10220 A (ANERGEN, INC.) 27 mai 1993 (1993-05-27) le document en entier	1-3, 6, 7, 9-16
Y		4, 5, 8
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F



## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 09064 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY OF NEW YORK) 25 février 1999 (1999-02-25) exemple revendications ---	1-3, 6-16
X	WO 97 28191 A (DADE INTERNATIONAL) 7 août 1997 (1997-08-07) exemples 2, 4-8 revendications figure 1C ---	1-3, 5-16
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 3949, 13 septembre 1999 (1999-09-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 144621, C. CULLEN ET AL.: "A divalent major histocompatibility complex/IgG1 fusion protein induces antigen-specific T cell activation in vitro and in vivo." XP002135726 abrégé & CELLULAR IMMUNOLOGY, vol. 192, no. 1, 25 février 1999 (1999-02-25), pages 54-62, New York ---	1-3, 6, 7, 9-16
Y	A. KALANDADZE ET AL.: "Expression of recombinant HLA-DR2 molecules." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 33, 16 août 1996 (1996-08-16), pages 20156-20162, XP002135710 Baltimore, MD, États-Unis cité dans la demande abrégé figures 1-3 ---	4
Y	J. ALTMAN ET AL.: "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." SCIENCE, vol. 274, no. 5284, 4 octobre 1996 (1996-10-04), pages 94-96, XP002135711 Washington, DC, États-Unis cité dans la demande page 94, colonne de droite ---	5
	--- -/--	

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>H. KOZONO ET AL.: "Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides."  NATURE,  vol. 369, no. 6476,  12 mai 1994 (1994-05-12), pages 151-154,  XP002135712  Londres, Grande Bretagne  cité dans la demande  abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	8

# RAPPORT DE REC CHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02193

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9806749 A	19-02-1998	AU 4072397 A EP 0935607 A	06-03-1998 18-08-1999
WO 9803552 A	29-01-1998	AU 3664597 A EP 0914347 A	10-02-1998 12-05-1999
WO 9310220 A	27-05-1993	AU 3220593 A	15-06-1993
WO 9909064 A	25-02-1999	AU 5428598 A EP 1007567 A	08-03-1999 14-06-2000
WO 9728191 A	07-08-1997	US 5869270 A AU 2253897 A CA 2244755 A EP 0877760 A	09-02-1999 22-08-1997 07-08-1997 18-11-1998